



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Raumzeitliche Dynamik des pflanzlichen K^+ -Kanals KAT1

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von
Dipl.-Biol. Muriel Reuff
aus Frankfurt am Main.

Berichterstatter: PD Dr. Ulrike Homann
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 29. Juni 2009
Tag der mündlichen Prüfung: 18. September 2009
Darmstadt 2009

D17

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Plasmamembran und Mikrodomänen	2
2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus für die Anordnung von Membranproteinen aufgrund von Mikrodomänen	4
2.2.1	Beispiele für Proteine in PM Mikrodomänen in <i>S. cerevisiae</i>	6
2.3	Beweglichkeit von Proteinen in der Plasmamembran.....	7
2.4	K ⁺ -Kanäle.....	8
2.4.1	K ⁺ -Kanal KAT1.....	8
2.4.2	Räumliche Anordnung und Clusterbildung von KAT1 in der PM.....	9
2.4.3	Kationenkanal HCN4, Beispiel für einen in Mikrodomänen lokalisierten K ⁺ -Kanal	10
2.5	Ziel der Arbeit.....	11
3	Material und Methoden.....	12
3.1	Chemikalien und Fluoreszenzfarbstoffe	12
3.2	Reaktionssysteme (Kits)	12
3.3	Organismen/Heterologe Expressionssysteme	13
3.3.1	<i>Escherichia coli</i>	13
3.3.2	<i>Human embryonic kidney cells</i> (HEK293)	14
3.3.3	<i>Chinese hamster ovary cells</i> (CHO-K1).....	14
3.3.4	<i>Vicia faba</i> (Ackerbohne)	15
3.3.5	<i>S. cerevisiae</i>	15
3.4	Molekularbiologie/Plasmide	21
3.4.1	pEGFP-N2:KAT1::GFP:.....	21
3.4.2	pcDNA:HCN4::GFP.....	22
3.4.3	pAVA319:KAT1::GFP.....	22
3.4.4	pVT100-U:HUP1::GFP	22
3.4.5	pYES2:KAT1::GFP	22
3.4.6	YIplac128:SUR7::mRFP und YIplac211:SUR7::GFP	23
3.4.7	pYEX-BX:rEAG1::yEGFP bzw. pYEX-BX:TOK1::yEGFP	23
3.4.8	Restriktionsverdau.....	23
3.4.9	Standard-PCR	23
3.4.10	Ligation	24
3.4.11	Agarosegelelektrophorese	24
3.4.12	Isolierung von Plasmid DNA	24
3.4.13	Quantifizierung der Plasmid DNA.....	24
3.5	Konfokale Laser Raster Mikroskopie (CLSM)	25
3.5.1	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i> (FRAP).....	25
3.5.2	Software.....	28
4	Ergebnisse.....	29
4.1	Untersuchung der lateralen Mobilität von K ⁺ -Kanälen durch <i>Fluorescence</i> <i>Recovery after Photobleaching</i> (FRAP).....	29
4.1.1	Laterale Mobilität des K ⁺ -Kanals KAT1 in der PM von <i>Vicia faba</i> Schließzellen.....	29
4.1.2	Laterale Mobilität des K ⁺ -Kanals KAT1 in der PM von HEK293 Zellen.....	31
4.1.3	Laterale Mobilität des K ⁺ -Kanals HCN4 in der Plasmamembran von HEK293 Zellen.	34
4.1.4	Laterale Mobilität der Kanäle KAT1 und HCN4 nach Sterolverarmung der Membran durch Methyl- β -Cyclodextrin.....	35
4.1.5	Laterale Mobilität des KAT1 Kanals nach Latrunkulin B Behandlung.....	39
4.1.6	Laterale Mobilität von KAT1 im ER.....	41
4.1.7	Zusammenfassung der FRAP Experimente.....	45

4.2	Lokalisation von Membranproteinen innerhalb der PM	47
4.2.1	Räumliche Anordnung von KAT1 in der PM.....	47
4.3	Lokalisationsstudien von KAT1 in <i>S. cerevisiae</i>	49
4.3.1	Expression von KAT1 in <i>S. cerevisiae</i>	49
4.4	Charakterisierung der Faktoren die zur Clusterbildung und Stabilisierung beitragen	57
4.4.1	Einfluss des Membranpotentials auf die räumliche Verteilung von KAT1 und HUP1.....	58
4.4.2	Einfluss der Osmolarität auf die Verteilung von Membranproteinen.....	62
4.4.3	Einfluss von Sterolen auf die räumliche Verteilung von KAT1.....	66
4.4.4	Einfluss der Zellwand auf die räumliche Verteilung von KAT1.....	68
4.4.5	Zusammenfassung der Lokalisationsstudien von KAT1 und anderen Membranproteinen in <i>S. cerevisiae</i>	72
5	Diskussion.....	74
5.1	Untersuchungen der lateralen Mobilität mit Hilfe der FRAP Technik.....	74
5.1.1	Technische Limitierung der FRAP Messungen.....	74
5.1.2	Laterale Mobilität von KAT1 in der PM von <i>Vicia faba</i> Schließzellen.....	75
5.1.3	Laterale Mobilität von KAT1 und HCN4 in der PM von HEK293 Zellen	76
5.1.4	Lokale Mobilität des KAT1 im ER.....	79
5.2	Räumliche Anordnung von KAT1 und anderen Membranproteinen innerhalb der PM	80
5.3	Faktoren die zur Clusterbildung und Stabilisierung beitragen	82
6	Referenzen.....	87

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Lokalisation, Anordnung und Dynamik des K⁺-Kanals KAT1 in der PM untersucht. Die Analyse der lateralen Mobilität des Kanals innerhalb der PM macht deutlich, dass KAT1 sehr stabil und unbeweglich innerhalb der PM lokalisiert ist. KAT1 zeigt in FRAP Messungen sowohl in pflanzlichen, als auch in tierischen Zellen eine sehr eingeschränkte laterale Mobilität. Die Beweglichkeit innerhalb der Membran konnte durch eine Sterolverarmung und damit einhergehender Auflösung der Membranmikrodomänen nicht signifikant gesteigert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass Sterole und sterolreiche Mikrodomänen nicht alleine für die Unbeweglichkeit von KAT1 verantwortlich sind. Eine Stabilisierung von KAT1 durch das kortikale Aktincytoskelett scheint unwahrscheinlich, da auch die Behandlung der KAT1 exprimierenden Zellen mit dem Aktininhistor Latrunkulin B nicht zu einer signifikanten Erhöhung der lateralen Beweglichkeit des KAT1 beiträgt.

Um Faktoren zu untersuchen, die einen Einfluss auf die Lokalisation von Membranproteinen in Mikrodomänen der PM haben und die Clusterbildung von KAT1 stabilisieren, wurde KAT1 heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert. Auch in *S. cerevisiae* zeigte der Kanal eine Lokalisation in Clustern in der PM, wie sie bereits für pflanzliche und tierische Expressionssysteme nachgewiesen wurde. Die Charakterisierung von verschiedenen Faktoren, die einen Einfluss auf die Bildung und Stabilisierung der Proteincluster in der PM haben, ergab, dass das Membranpotential keinen Einfluss auf die Verteilung des KAT1 Kanals hat. Auch die weiteren getesteten Faktoren, Osmolarität des umgebenden Mediums, Sterolgehalt der Membran, sowie Interaktion mit der Zellwand, wirkten sich alleine nicht auf die Lokalisation von KAT1 aus. Eine Auflösung der KAT1 Cluster sowie eine homogene Verteilung des Kanals in der PM konnte nur durch Entfernung der Zellwand bei gleichzeitiger Blockierung der Sterolsynthese in der Δ erg6 Mutante induziert werden. Hieraus kann abgeleitet werden, dass KAT1 mindestens durch die beiden Faktoren Interaktion mit der Zellwand und Interaktion mit Sterolen bzw. Sterol assoziierten Mikrodomänen der PM, stabil in Clustern positioniert wird.

2 Einleitung

2.1 Plasmamembran und Mikrodomänen

Biologische Membranen dienen zur Abgrenzung gegen das Außenmedium, sowie zur Abgrenzung einzelner Organellen und Reaktionsräume im Innern der Zelle. Ihre Lipiddoppelschicht bildet dabei eine selektiv permeable Barriere, die nur fettlösliche Moleküle, unpolare Gase und sehr kleine Moleküle wie Harnstoff einfach passieren lässt.

Die Lipide der Lipiddoppelschicht haben einen amphipathischen Charakter. Sie besitzen eine polare Kopfgruppe (hydrophil) und hydrophobe Fettsäurereste. In wässriger Umgebung bilden solche Lipide spontan *bilayer*, wobei die hydrophoben Reste von der wässrigen Phase abgewandt und gegeneinander orientiert sind, während die hydrophilen Kopfgruppen zur wässrigen Phase hin orientiert sind. Die beiden Monolayer besitzen oft eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung, sodass die Lipiddoppelschicht asymmetrisch aufgebaut ist. Die exoplasmatische Hälfte der Doppelschicht besteht in tierischen Zellen überwiegend aus dem Phospholipid Phosphatidylcholin und dem Glykosphingolipid Sphingomyelin, während die protoplasmatische Hälfte hauptsächlich aus den Phospholipiden Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin gebildet wird (Verkleij *et al.*, 1973). Neben Phospho- und Sphingolipiden gibt es noch die Sterole, von denen in Säugetierzellen nur das Cholesterol vorkommt. Cholesterol ist in beiden Hälften der Lipiddoppelschicht lokalisiert.

Singer und Nicolson (Singer und Nicolson, 1972) postulierten für biologische Membranen das Flüssig-Mosaik-Modell, welches eine fluide und dynamische Lipiddoppelschicht mit lateral beweglichen, peripheren und integralen Membranproteinen beschreibt. Das Ausmaß der Beweglichkeit hängt, bei gleicher Temperatur, weitgehend von der Fluidität der Membran ab, die ihrerseits abhängig ist von der Anordnung und den Interaktionen der Fettsäureketten der Membranlipide. Langkettige, gesättigte Fettsäuren lagern sich eng zusammen und durch starke Wechselwirkungen entstehen recht feste Strukturen mit verringerter Fluidität. Ungesättigte Fettsäuren können aufgrund der Doppelbindungen in *cis*-Stellung weniger enge Verbindungen eingehen und es entstehen Membranstrukturen mit größerer Fluidität. Sterole reduzieren die Membranfluidität, indem sie die Beweglichkeit der Fettsäureketten herabsetzen.

Simons und Ikonen (1997) konnten zeigen, dass biologische Membranen lateral inhomogen gestaltet sind und Mikrodomänen auch sogenannte *lipid rafts* enthalten, die sich durch eine besondere Lipidzusammensetzung, unterschiedliche Fluidität, Dicke und Akkumulation von bestimmten Proteinen auszeichnen. Diesen „Plattformen“, in der sonst fluideren Membran werden wichtige Rollen bei der Organisation von Signalübertragungs-

und Sortierungsprozessen zugeschrieben (Simons und Toomre, 2000; Rajendran und Simons, 2005). Außerdem konnte eine Beteiligung an Exocytose (Salaun *et al.*, 2004), Endocytose (Parton *et al.*, 2003), Organisation und Interaktion mit dem Aktincytoskelett (Meiri, 2005; Plowman, 2005), Eintritt von Pathogenen in die Zelle (Rosenberger *et al.*, 2000) und Apoptose (Garcia *et al.*, 2003) gezeigt werden.

Der Durchmesser dieser kleinen *lipid raft* Mikrodomänen wird zwischen 10 und 200 nm angegeben (Pralle *et al.*, 2000; Edidin, 2003), wobei gerade über die Größe, Komposition und Dynamik dieser Membrandomänen eine rege Debatte besteht (Maxfield, 2002; Brown, 2006; Viola & Gupta, 2007). Der erste Ansatz diese Mikrodomänen zu beschreiben war, sie über die Art ihrer Aufreinigung zu charakterisieren. Der als *lipid raft* bezeichnete Membrananteil zeichnet sich durch Unlöslichkeit in milden, nichtionischen Detergentien, wie Triton X-100 bei 4°C aus (Schroeder *et al.*, 1994; Brown und Rose, 1992; Rietveld und Simons, 1998), weswegen die *lipid raft* Mikrodomänen auch als DRM (*detergent resistant membranes*) bezeichnet werden. Mittlerweile wird aber vermutet, dass die Isolation bei tiefen Temperaturen die Phasenseparation der Membran künstlich erhöht und so auch eine künstliche *raft*-Bildung erzeugen könnte (Brown, 2006). Die verminderte Löslichkeit in Detergentien ist vor allem dadurch zu erklären, dass diese Mikrodomänen besonders dicht gepackt sind. Im Vergleich zum Rest der Lipiddoppelschicht, die hauptsächlich aus Phospholipiden besteht, kommt in den Mikrodomänen ein großer Anteil an Sphingolipiden und Sterolen vor (Abb. 2.1). Durch die größtenteils gesättigten Kohlenwasserstoffreste der Sphingolipide können sich die Cholesterole in den „Lücken“ zwischen den Kohlenwasserstoffketten besonders dicht anlagern und über Wasserstoffbrücken gebunden werden (Schroeder *et al.*, 1994; Pralle *et al.*, 2000), wodurch sich hier eine besonders kompakte Anordnung innerhalb der Membran ergibt. Solche Membrandomänen befinden sich im sogenannten *liquid ordered* Zustand, die von fluideren Membranregionen umgeben sind, die sich im sogenannten *liquid disordered* Zustand befinden. In dieser Region besteht die Membran größtenteils aus Phospholipiden mit ungesättigten Alkyl-Resten und vereinzelt Sterolen (Brown und London, 1998). In Modellmembranen konnte noch eine weitere sogenannte *gel phase*-Konformation der Membran gefunden werden, bei der die Lipid Komponenten noch weiter kondensiert und sehr unbeweglich sind (Heberle *et al.*, 2005). Durch die dichtere Packung der Lipide und Sterole ist die Membran im Bereich der *lipid rafts* dicker als in der Umgebung. Dies könnte auch ein Grund sein, dass sich manche Membranproteine bevorzugt in *lipid rafts* anreichern. Proteine, die vorwiegend in Mikrodomänen vorkommen, sind zum Beispiel GPI (Glycosylphosphatidylinositol) verankerte Proteine, acetylierte Proteine und häufig Transmembranproteine, die die Mikrodomänen zusätzlich stabilisieren. Die Mikrodomänen werden daher als relativ unbewegliche Bestandteile innerhalb der fluiden

Membran angesehen. Einige Studien haben ergeben, dass es einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Cholesterolzusammensetzung und einem veränderten Diffusionsverhalten von Proteinen in der Membran gibt (Pucadyil und Chattopadhyay, 2006). Hierzu wurden die Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD) behandelt, was eine Cholesterolverarmung der Membran zur Folge hat (Christian *et al.*, 1997; Yancey *et al.*, 1996), die auch in pflanzlichen Tabak Zellen gezeigt werden konnte (Roche, 2008).

Eine Lokalisation in Mikrodomänen der Plasmamembran (PM) konnte zum Beispiel bereits für die spannungsabhängigen K⁺-Kanäle Kv 1.4 und Kv 4.2 in Neuronen des Hippocampus der Ratte (Wong und Schlichter, 2003), den Kationenkanal HCN4, exprimiert in HEK293 Zellen (Barbuti *et al.*, 2004) und den Hexose Proton Symporter HUP1 aus *Chlorella*, exprimiert in *Saccharomyces cerevisiae* (Grossmann *et al.*, 2006) gezeigt werden. Auch in pflanzlichen Zellen wie zum Beispiel in Tabak und Arabidopsis konnten Mikrodomänen in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Mogrand *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005; Minami *et al.*, 2009). Nach dem zurzeit vorherrschenden Bild der Plasmamembran setzt sich die gesamte Membran aus einem Mosaik von Mikrodomänen zusammen, die sowohl zeitlich als auch räumlich sehr variabel sind (Maxfield, 2002; Kusumi & Suzuki, 2005).

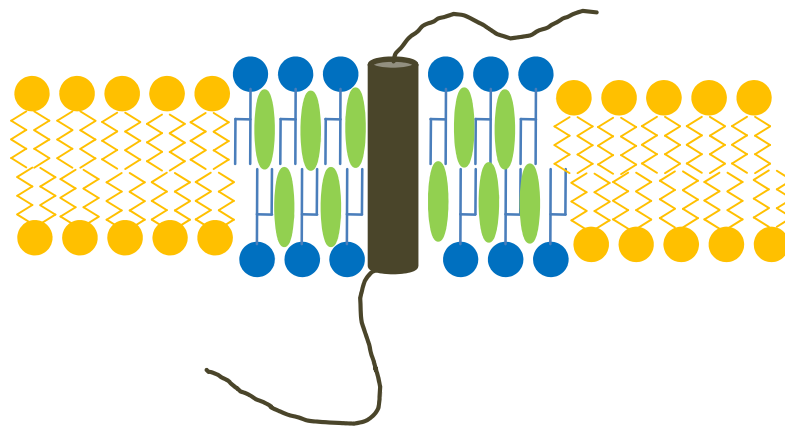


Abb. 2.1 Lipid raft Mikrodomänen. Im Bereich der *lipid rafts* ist die Membran besonders reich an Sphingolipiden (blau dargestellt), zwischen denen sich Sterole (grün) befinden. Im Gegensatz zur restlichen Membran, die hauptsächlich aus Phospholipiden (gelb) besteht, ist die Membran im Bereich der *lipid rafts* aufgrund der kompakteren Anordnung weniger fluid. Durch die länger-kettigen Sphingolipide und die dichte Anlagerung von Sterolen ist die Membran etwas dicker, wodurch sich hier bestimmte Membranproteine anreichern können. (nach Fantini *et al.*, 2002).

2.2 *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus für die Anordnung von Membranproteinen aufgrund von Mikrodomänen

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist als heterologes Expressionssystem weit verbreitet. Seit der ersten heterologen Expression eines humanen Interferons in *S. cerevisiae* (Hitzeman *et al.*,

1981) und der Sequenzierung des etwa 12 000 kb großen, etwa 6 000 *open reading frames* (ORF) umfassenden Genoms (Goffeau *et al.*, 1996) hat sich der eukaryontische Organismus zum Modellsystem für viele genetische und zellbiologische Fragestellungen entwickelt. Ein großer Vorteil des Modellorganismus ist es auch, dass *S. cerevisiae* über homologe Rekombination genetisch recht gut manipuliert werden kann. Giaever *et al.* (2002) konnten bereits für 96 % der ORFs Deletionsmutanten erzeugen und deren Auswirkungen unter verschiedenen Bedingungen untersuchen.

S. cerevisiae eignet sich auch besonders als Modellsystem für die Anordnung von Membranproteinen in PM Mikrodomänen, da diese hier bereits gut untersucht sind. Ebenso wie in tierischen und pflanzlichen Zellen wurden in Hefen Domänen der PM aufgrund ihrer Unlöslichkeit in Triton X-100 als *lipid rafts* beschrieben (Kübler *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu Säugerzellen, bei denen sich die *lipid rafts* hauptsächlich aus Sphingomyelin, Glycosphingolipiden und Cholesterol zusammensetzen, bestehen die *lipid rafts* in Hefe hauptsächlich aus Inositphosphoceramid, dessen mannosylierten Derivaten und Ergosterol (Kübler *et al.*, 1996; Bagnat *et al.*, 2000). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Assoziation mit *raft*-typischen Lipiden bei Hefen bereits im ER erfolgt (Bagnat *et al.*, 2000). Neben den sogenannten *lipid rafts* scheint die PM der Hefen noch weitere Untergliederungen aufzuweisen. Bei der Untersuchung der Verteilung von drei endogenen Plasmamembranproteinen konnten Malinska *et al.* (2003) mindestens drei unterschiedliche Lokalisationsmöglichkeiten innerhalb der PM feststellen: Zum einen eine homogene Verteilung über die gesamte PM, wie es für den Zuckertransporter Hxt1 gezeigt wurde. Zum zweiten eine irreguläre, netzartig Verteilung, bei der einige Bereiche ausgespart bleiben, wie für die H⁺-ATPase Pma1 dargestellt, und drittens die genau inverse, punktförmige Verteilung, wie für den Arginin-H⁺-Symporter Can1 beobachtet, bei der genau die etwa 300 nm großen „Lücken“ der Pma1 mit Can1 besetzt sind (Malinski *et al.*, 2003). Diese inverse Verteilung von Pma1 und Can1 ist besonders interessant, da die beiden Proteine Pma1 und Can1 nach der DRM Charakterisierung *lipid raft* assoziiert sind. Die sich durch die Lokalisation von Can1 und Pma1 ergebenden Kompartimente der Hefe PM werden auch als MCC (*membrane compartment occupied by Can1*) und MCP (*membrane compartment occupied by Pma1*) bezeichnet (Grossmann *et al.*, 2007). Für die korrekte Sortierung von Pma1 in das MCP Kompartiment sind vor allem die Sphingolipide, nicht aber die Sterole von Bedeutung (Gaigg *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu ist das MCC Kompartiment mit Sterolen assoziiert, die in Hefen meist als Sterolderivat Ergosterol vorliegen. Für die korrekte Lokalisation des MCC assoziierten Proteins Tat2 (Tryptophan Permease) konnte dargestellt werden, dass Ergosterol für seine korrekte Lokalisation in MCCs notwendig ist (Umebayashi und Nakano, 2003). Im Bereich der MCC konnten insgesamt 21 Proteine nachgewiesen werden (Grossmann *et al.*, 2008). Eines davon ist das

integrale Membranprotein SUR7. SUR7 ist eine Proteinkomponente der in Hefen beschriebenen *hot spots* der Endocytose, den sogenannten Eisosomen (Walther *et al.*, 2006). Die punktförmigen MCC Kompartimente der Hefe PM sind überaus stabil und unbeweglich. Malinska *et al.* (2004) konnten nachweisen, dass die MCC Kompartimente über die Zeit von einer Stunde keinerlei Mobilität zeigten. Eine Interaktion mit dem Cytoskelett oder der Zellwand ist unwahrscheinlich, da auch durch die Depolymerisation des F-Aktins und die Entfernung der Zellwand keine Mobilität zustande kam. Wahrscheinlich beruht die Stabilität der MCC auf dem großen Anteil an Ergosterol. Xu *et al.* (2001) konnten zeigen, dass Ergosterol im Vergleich zu anderen Sterolen sehr stabile *lipid rafts* bildet. Hinzu kommt, dass der molare Quotient von Ergosterol zu Phospholipiden in Hefen höher ist als in Säugetierzellen (Opekarova und Tanner, 2003).

Über die physiologische Rolle der MCC Kompartimente ist noch nicht viel bekannt. Grossmann *et al.* (2008) nehmen an, dass Proteine innerhalb der MCC vor Endocytose geschützt sind und die Lokalisation in MCC damit auch den *turnover* der Proteine beeinflusst.

2.2.1 Beispiele für Proteine in PM Mikrodomänen in *S. cerevisiae*

2.2.1.1 SUR7

Das Membranprotein SUR7 aus *S. cerevisiae* wurde 1997 von Sivadon *et al.* (1997) bei einem *screening* an Hefemutanten erstmals beschrieben. Sivadon *et al.* (1997) berichteten, dass SUR7 die Funktion des Aktin-bindenden Proteins Rsv167 teilweise ersetzen kann. Eine Deletion von SUR7 weist nur geringe Effekte auf und die Expression von SUR7 scheint für das Überleben der Hefen nicht essentiell zu sein. Zur SUR7 Familie werden auch die Proteine Ynl94p und Ydl222p gerechnet (Sivadon *et al.*, 1997). Für Ynl94p und Ydl222p konnte gezeigt werden, dass sie nach osmotischem Schock vermehrt exprimiert werden (Rep *et al.*, 2000; De Risi *et al.*, 1997). Young *et al.* (2002) konnten die Proteine der SUR7 Familie in cortikalen Clustern nachweisen, die nicht mit Aktinclustern koloalisiert sind. Dabei ergab sich, dass die Lokalisation von SUR7 in cortikalen Clustern von einer extrazellulären Interaktion mit der Zellwand abhängig ist. Weiterhin scheint SUR7 an der Sporulation beteiligt zu sein und die Sphingolipid Zusammensetzung der Membran zu beeinflussen (Young *et al.*, 2002). Auch in der Hefe *Candida albicans* ist SUR7, wie in *S. cerevisiae*, in MCC ähnlichen Flecken in der PM lokalisiert. Allerdings zeigen SUR7 Deletionsmutanten in *Candida albicans* eine gestörte Endocytose, Aktinlokalisierung und eine gestörte räumliche Regulation des Zellwandwachstums (Alvarez *et al.*, 2008). Interessanterweise wurde im extrazellulären Loop von SUR7 ein konserviertes Motiv

gefunden, das auch in Claudin Proteinen vorhanden ist, die in tierischen Zellen an den Zell-Zell-Verbindungen, den sogenannten *tight junctions*, vorliegen (Alvarez *et al.*, 2009).

2.2.1.2 HUP1

HUP1 (*hexose uptake protein*) ist ein Hexose-Protonen-Symporter aus *Chlorella kessleri*, der zur großen Gruppe der *transmembrane facillitators* gehört, die auch Uniporter und Antiporter umfasst. Die *transmembrane facillitator* Proteine setzen sich aus 12 Transmembran Helices zusammen. Bei einer Expression des HUP1::GFP Fusionsproteins in *S. cerevisiae* beobachteten Grossmann *et al.* (2007) ebenfalls eine Anordnung des Proteins in Clustern, die mit anderen MCC Proteinen kolokalisieren. Grossmann *et al.* (2007) beobachteten aber unter bestimmten Bedingungen auch eine homogene Verteilung des Symporters in der PM. Die homogene Verteilung des Symporters führen Grossmann *et al.* (2007) dabei auf eine Depolarisation des Membranpotentials zurück.

2.3 Beweglichkeit von Proteinen in der Plasmamembran

Das Diffusionsverhalten von Membranproteinen wird durch die oben genannten Mikrodomänen beeinflusst. Neben der Unterteilung der Plasmamembran in unterschiedliche Membrandomänen mit unterschiedlichen Lipid- und Proteinzusammensetzungen kommt es auch durch das cortikale Cytoskelett direkt unterhalb der Membran zu einer Strukturierung der Membran. Nach dem Plasmamembranmodell von Kusumi *et al.* (2005), bildet Aktin über eine Interaktion mit Lipid-bindenden Proteinen ein Aktin-basiertes Netz, auch bildlich als „Zaun“ beschrieben, der über Transmembranproteine, die „Pfosten“, stabilisiert wird. Neben den Protein-Lipid-Interaktionen in Lipidmikrodomänen der Membran kann auch dieses Netzwerk die Diffusionseigenschaften von Proteinen in der Plasmamembran beeinflussen. Proteine, die auf der einen Seite mit Aktin interagieren und auf der anderen Seite mit DRMs assoziiert sind, sind zum Beispiel Proteine der ERM Familie, die durch Phosphoinosid-Lipide aktiviert werden und in ihrem aktiven Zustand an Aktin binden können (Tsukita *et al.*, 1997), oder Vinculin (Wirth *et al.*, 2009), das an der Membran-Cytoskelett-Interaktion an den *focal adhesion* Zellverbindungen beteiligt ist. Besonders interessant ist auch, dass Leonoudakis *et al.* (2004) kürzlich durch *pull down* Experimente und Affinitätschromatographie zeigen konnten, dass der K⁺-Einwärtsgleichrichter Kir 2.2, durch eine Verbindung mit einem weiteren Protein, mit einem Aktin bindenden Protein LIM assoziiert ist.

Weiterhin kann die Diffusion von Proteinen in der Membran auch durch vermehrte Protein-Protein-Interaktion (*molecular crowding*) und Clusterbildung beeinträchtigt werden (Kirchhoff, 2008).

2.4 K⁺-Kanäle

Mit der Lipiddoppelschicht der Membran besitzen Zellen eine schützende Barriere und Kompartimentierung, die sie zum Außenmedium abgrenzt. Durch das hydrophobe Innere der Lipiddoppelschicht ist die Membran nahezu undurchlässig für Ionen und geladene größere Moleküle. Dennoch ist ein Austausch mit dem Außenmedium wichtig. Zum Beispiel um Nährstoffe aufzunehmen oder lebenswichtige elektrochemische Gradienten für den Energiehaushalt aufrecht zu erhalten. Die Translokation von Ionen und anderen Substraten erfolgt über Ionenkanäle oder Transporter. Ionenkanäle sind Transmembranproteine, die die Membran durchspannen und den schnellen Durchtritt von Ionen ermöglichen. Der Durchtritt der Ionen erfolgt durch passive Diffusion entlang des elektrochemischen Gradienten.

Ionenkanäle werden aufgrund ihrer Ionenselektivität, der Topologie oder ihres Aktivierungsmechanismus in verschiedene Gruppen, wie spannungsgesteuerte Ionenkanäle, mechanosensitive Kanäle oder ligandengesteuerte Ionenkanäle unterteilt.

Kanäle die zur „Superfamilie“ der K⁺-Kanäle gehören, sind an vielen physiologischen Prozessen beteiligt, wie der Aufrechterhaltung des zellulären Ruhepotentials oder der neuronalen Erregbarkeit. Die Funktion, Struktur und vor allem die Regulation von K⁺-Kanälen ist interessant, da eine gestörte Funktion oder Regulation von K⁺-Kanälen häufig zu Herz-Erkrankungen, Diabetes und neuronalen Krankheiten führt. In Pflanzen spielen K⁺-Kanäle eine wichtige Rolle bei der K⁺-Aufnahme in die Wurzel, der Abgabe von Kalium ins Xylem und der Öffnung der Stomata. Für die Regulation des Öffnens und Schließens der stomatären Pore kommt es zu einem schnellen Kalium-Flux über die Plasmamembran der Schließzellen, der einen osmotisch bedingten Wasserein bzw. Wasserausstrom zur Folge hat. Die Kalium Leitfähigkeit der Schließzellmembran wird vor allem durch Mitglieder der *shaker*-ähnlichen Kanäle bestimmt. In *Arabidopsis thaliana* wurde ein *shaker*-ähnlicher Kanal, GORK (Hosy *et al* 2003), gefunden, der den Kalium-Auswärtsstrom leitet. Am Kalium-Einstrom in die Schließzellen sind in *Arabidopsis thaliana* mindestens 5 *shaker*-ähnliche Kanäle (KAT1, KAT2, AKT1 und AtKC1) beteiligt (Szyroki *et al.*, 2001).

2.4.1 K⁺-Kanal KAT1

KAT1 ist ein spannungsregulierter K⁺-Einwärtsgleichrichter aus *Arabidopsis thaliana* der 1992 von Schachtman *et al.* kloniert werden konnte. Der Kanal wird aufgrund des Aufbaus seiner Transmembranbereiche und Porenregion der Familie der *shaker*-ähnlichen Kanäle zugeordnet, die alle nach dem gleichen Prinzip aufgebaut sind. Ein Monomer des Kanals besteht, wie in Abb. 2.2. gezeigt, aus 6 Transmembrandomänen S1 bis S6. Die Porenregion,

die zwischen S5 und S6 liegt, trägt die K⁺-Kanal-Signatur-Sequenz GYG (Heginbotham *et al.*, 1994). Die Transmembrandomäne S4 bildet den Spannungssensor. Der eigentliche Kanal wird durch ein Tetramer aus 4 α -Untereinheiten gebildet. KAT1 hat einen relativ kurzen (63 Aminosäuren) cytosolischen N-Terminus und einen relativ langen (297 Aminosäuren) C-Terminus. Im C-Terminus befindet sich eine putative Bindestelle für zyklische Nukleotide cNBD (*cyclic nucleotide binding domain*), die auch bei den HCN Kanälen vorkommt. Erst kürzlich wurde im C-Terminus des KAT1 innerhalb der cNBD Domäne eine Signalsequenz aus sauren Aminosäuren identifiziert, die für den effizienten ER-Export des Kanals verantwortlich ist (Mikosch *et al.*, 2006). Über diese ER-Export-Signalsequenz ist es möglich, die Proteinsortierung (Trafficking) des Kanals zu regulieren. Dies stellt für die Zelle auch eine Möglichkeit dar, die Anzahl der aktiven Kanäle in der Membran zu kontrollieren. Am Ende des C-Terminus hat KAT1 eine K_{HA} Interaktionsdomäne, die vermutlich die Clusterbildung des Kanals begünstigt (Erhardt *et al.*, 1997).

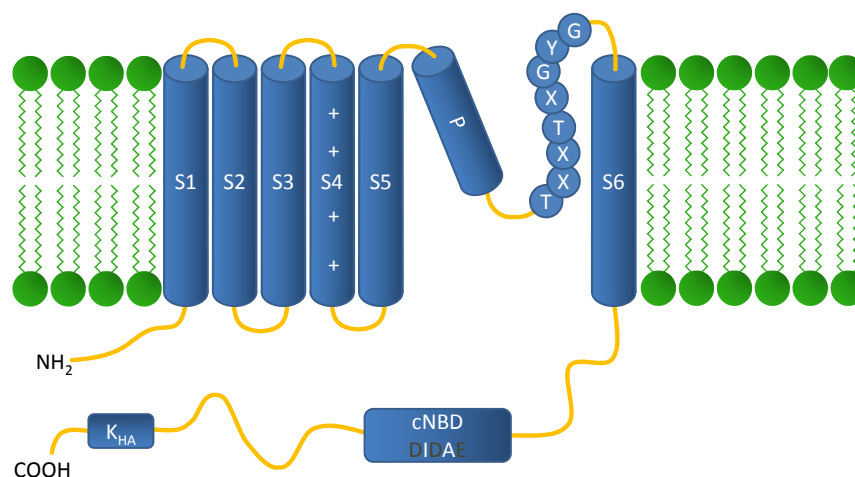


Abb. 2.2 Schematische Darstellung eines KAT1 Monomers. Ein KAT1 Monomer gliedert sich in sechs Transmembrandomänen S1 bis S6. Zwischen S5 und S6 befindet sich die Porenregion mit der für K⁺-Kanäle typischen Signatursequenz GYG. Im langen, cytosolischen C-Terminus befindet sich innerhalb der cNBD Domäne das ER-Exportmotiv DIDAE und am Ende die K_{HA} Interaktionsdomäne.

2.4.2 Räumliche Anordnung und Clusterbildung von KAT1 in der PM

Bei Lokalisationsstudien des KAT1::GFP Fusionsproteins in *Vicia faba* Schließzellen zeigt KAT1 eine ausgeprägte Verteilung in radialen Streifen in der PM (Homann *et al.*, 2007). Das Verteilungsmuster von KAT1 in Schließzellen ist unabhängig von der Spaltöffnung der Schließzellen und den Cytoskeletoninhibitoren Latrunkulin B und Propyzamide. Durch Induzieren von Plasmolyse, bei der sich die PM von der Zellwand löst, kommt es aber zur Auflösung des Streifenmusters. Daher wird vermutet, dass die Organisation der radialen Verteilung durch den engen Kontakt mit der Zellwand entsteht. Diese radiale Anordnung in der PM ist zelltypspezifisch und tritt nur in Schließzellen auf. In Epidermiszellen zeigt der Kanal eine punktförmige Verteilung. Eine punktförmige Anordnung von KAT1

Clustern in der PM wurde auch in intakten Tabak Epidermiszellen und Protoplasten gezeigt (Sutter *et al.*, 2006). Bei einer genaueren Betrachtung der radiären Streifen ist zu erkennen, dass die Streifen sich wiederum aus vielen kleinen Clustern zusammensetzen. Die Anordnung von KAT1 in Clustern wurde auch in Protoplasten von *Vicia faba* Schließzellen beobachtet. Parallele elektrophysiologische Messungen von Leitfähigkeit und Kapazität an KAT1 exprimierenden *Vicia faba* Schließzellprotoplasten lassen vermuten, dass eine Regulation der Dichte der Kanäle in der PM über die Exo- und Endocytose von in Clustern organisierten Kanälen erreicht wird (Hurst *et al.*, 2004).

2.4.3 Kationenkanal HCN4, Beispiel für einen in Mikrodomänen lokalisierten K⁺-Kanal

Der tierische Kationenkanal HCN4 kommt im Gehirn, der Retina und vor allem im Sinusknoten des Herzens vor, wo er als Schrittmacherkanal am Impuls für den Herzschlag beteiligt ist. In Säugetieren wurden bisher vier Isoformen HCN1 bis HCN4 gefunden. (Ludwig *et al.*, 1999) HCN4 zählt, wie KAT1, ebenfalls zur Familie der spannungsabhängigen *shaker*-ähnlichen Kanäle. Im Bereich des C-Terminus zeigt KAT1 eine hohe Ähnlichkeit zu tierischen HCN Kanälen. HCN Kanäle werden bei einer Hyperpolarisation der Membran ab 50 mV aktiviert. Weiterhin kann die direkte Bindung von cAMP an den Kanal die Leitfähigkeit und die Aktivierbarkeit des Kanals beeinflussen.

Wie KAT1 wird der HCN4 Kanal durch ein Tetramer gebildet. Die Monomere sind auch aus den Transmembransegmenten S1 bis S6 aufgebaut. Die Porenregion trägt ebenfalls die typische Signatursequenz GYG der K⁺-Kanäle im Selektivitätsfilter. Im C-Terminus hat der HCN4 im Vergleich zu KAT1 auch die cNBD Sequenz, jedoch keine K_{HA}-Domäne.

Da HCN4 große Ähnlichkeiten zu KAT1 zeigt, wurde er bei den vorliegenden Untersuchungen als Vergleich herangezogen. Besonders interessant macht den Vergleich mit HCN4, dass er nach Barbuti *et al.* (2004) in sogenannten *lipid rafts* vorliegt. Barbuti *et al.* (2004) konnten HCN4 zusammen mit dem Markerprotein Flotillin aus der Membran von HEK293 Zellen in einem Saccharosegradienten in der *lipid raft* Fraktion nachweisen. Weiterhin konnten sie zeigen, dass eine Zerstörung der *lipid rafts* nach einer Sterolverarmung durch MBCD eine Auswirkung auf die Lokalisation von HCN4 und auf die Kinetik des Kanals hat.

2.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation, Anordnung und Dynamik des K⁺-Kanals KAT1 in der Plasmamembran zu untersuchen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die laterale Mobilität des Kanals in der Plasmamembran mit Hilfe von *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) Experimenten beurteilt. Die laterale Beweglichkeit des Kanals wurde im pflanzlichen und im tierischen Zellsystem, in der unbehandelten Plasmamembran im Vergleich zu Sterol verarmten Zellen oder Zellen mit gestörter Aktinpolymerisation analysiert, um Rückschlüsse auf die Faktoren zu erhalten, die an der räumlichen Positionierung des Kanals in der Plasmamembran beteiligt sind.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Anordnung des KAT1 Kanals in Clustern innerhalb der PM. Für die Charakterisierung der KAT1 Cluster wurden tierische Zellen (HEK293 und CHO-K1 Zellen) und *S. cerevisiae* Zellen als heterologe Expressionssysteme verwendet. Besonders *S. cerevisiae* eignete sich hier als etabliertes Modellsystem, das sich durch gut untersuchte PM Mikrodomänen auszeichnet. Über den Vergleich mit anderen Membranproteinen, die ebenfalls in Clustern vorliegen und durch die Charakterisierung der Bedingungen, die einen Einfluss auf diese Cluster haben, sollten Rückschlüsse auf die Faktoren gezogen werden, die die Anordnung von KAT1 in Clustern in der PM beeinflussen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Fluoreszenzfarbstoffe

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), Fermentas (St. Leon-Rot), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) und die Restriktionsendonukleasen wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

3.2 Reaktionssysteme (Kits)

Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo-Research, Orange, Kalifornien, USA)

GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

DNA Clean & Concentrator™ (Zymo-Research, Orange, Kalifornien, USA)

Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo-Research, Orange, Kalifornien, USA)

Frozen-EZ Yeast Transformation II™ (Zymo-Research, Orange, Kalifornien, USA).

Bei den Reaktionssystemen wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Die DNA Elution wurden mit ddH₂O anstatt mit dem mitgelieferten Elutionspuffer durchgeführt.

Methyl-β-Cyclodextrin (MBCD)

Um Effekte der Sterolverarmung der PM zu untersuchen, wurde MBCD eingesetzt. MBCD ist ein zyklisches Glukoseoligomer, durch das der Sterol Gehalt der PM modifiziert werden kann (Yancey *et al.*, 1996). Dabei bildet MBCD einen Komplex mit den Sterolen der Plasmamembran. Die lipophilen Sterole ordnen sich im hydrophoben Inneren des Komplexes an. Die Wasserlöslichkeit der Sterole wird dadurch stark erhöht, wodurch sie aus der Membran herausgewaschen werden (Ilanguaran & Hoessli, 1998). MBCD kann daher eingesetzt werden, um die Membran an Sterolen zu verarmen und sterolreiche Mikrodomänen der Membran zu zerstören.

MBCD wurde als 100 mM Stocklösung in DMSO angesetzt und bei 4 °C gelagert. Für die Experimente wurden die HEK293 Zellen für 1,5 Stunden bei 37 °C in einer 5 mM MBCD-Lösung inkubiert. Hierfür wurden 100 µl der 100 mM MBCD Stocklösung zu 2 ml Transfektionsmedium gegeben.

Latrunkulin B

Das ursprünglich aus dem Schwamm *Latrunculia magnifica* isolierte, Aktin bindende Toxin verhindert die Aktinpolymerisation und wird als Zytoskelett Inhibitor verwendet.

Latrunkulin B wurde mit einer Endkonzentration von 10 μM direkt in HEK293 Medium eingesetzt. Die Zellen wurden vor dem Mikroskopieren mindestens 20 Minuten nach Latrunkulin Zugabe inkubiert.

FM4-64

Der Membranfarbstoff FM4-64 (Invitrogen, Karlsruhe) gehört zur Gruppe der amphiphilen Membranfarbstoffe. Er besteht aus einer kationischen, hydrophilen Kopfgruppe und einem lipophilen Schwanz aus zwei Kohlenstoffketten, mit dem er sich in die Membran einlagern kann. FM4-64 wurde als 10 μM Lösung eingesetzt.

3.3 Organismen/Heterologe Expressionssysteme

3.3.1 *Escherichia coli*

Für die Vermehrung der jeweiligen Plasmide wurden kompetente Zellen des Laborstamms *E. coli* XL 1 (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

E. coli wurde in Luria und Bertani (LB) Medium kultiviert. Durch die Zugabe der Antibiotika Ampicillin oder Kanamycin (Ampicillin 100 mg/l; Kanamycin 50 mg/l) wurde ggf. auf Bakterien selektioniert, die ein Plasmid mit dem entsprechenden Selektionsmarkergen trugen. Flüssigkulturen wurden bei 37 °C und 2200 rpm im Schüttler und Platten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.3.1.1 Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Für die Hitzeschocktransformation wurde der *E. coli* Stamm XL1 verwendet. Die Bakterien wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanaham, 1985) kompetent gemacht. Für die Transformation wurden 50 μl der Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 μl Plasmid DNA gemischt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Zu den Zellen wurde dann 250 μl SOC Medium gegeben. Die Bakterien wurden zur Regeneration 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt und anschließend auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.1.2 Nährmedien *Escherichia coli*

LB-Flüssigmedium:

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert.

LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5 % Agar autoklaviert.
Selektionsmedien:	Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 100 mg/l) bzw. Kanamycin (Endkonzentration 50 mg/l) zu autoklaviertem, auf 50 °C abgekühltem LB-Flüssigmedium oder LB-Agar.
SOC-Medium:	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 20 mM MgCl ₂ 20 mM Glukose mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert.

3.3.2 *Human embryonic kidney cells* (HEK293)

Die eukaryontische Zelllinie „*human embryonic kidney cells*“ (HEK293) wurde durch Einbringen gescherter Adenovirus DNA in embryonale menschliche Nierenzellen hergestellt (Graham *et al.*, 1977). Die Zellen wurden in DMEM/F12 mit 10 % (v/v) FCS, 2,5 mM Glutamin und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-begasten Brutschrank (Heraeus) unter standardisierten Bedingungen von 37° C und 5 % CO₂.

3.3.3 *Chinese hamster ovary cells* (CHO-K1)

Die CHO-K1 Zellen (Puck, 1957) wurden mit den gleichen Medien und Bedingungen angezogen, wie die HEK293 Zellen. CHO-K1 Zellen gelten ebenfalls als gut etabliertes Expressionssystem für Ionen Kanäle (Gamper *et al.*, 2005).

3.3.3.1 Transfektion der HEK293 und CHO-K1 Zellen

Zum Einschleusen von Plasmiden wurde das Mittel TransFectin (Bio Rad) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

3.3.3.2 Lösungen und Nährmedien für HEK293 und CHO-K1 Zellen

Nährmedium:	DMEM/F12 (1:1) Medium mit L-Glutamin 10 % FCS 10 ml/l Penicillin/Streptomycin-Lösung
--------------------	--

PBS: 8 g/l Natriumchlorid
 0.2 g/l Kaliumchlorid
 1.42 g/l Dinatriumhydrogenphosphat
 0.24 g/l Kaliumhydrogenphosphat
 mit 1 M Natronlauge auf pH 7.0 eingestellt und
 sterilfiltriert.

Transfektionsmedium: DMEM/F12 (1:1) Medium mit L-Glutamin

3.3.4 *Vicia faba* (Ackerbohne)

Als pflanzliches Expressionssystem wurde *Vicia faba* L. cv. *Hangdown* verwendet und diese in einer Klimakammer mit 14/10 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Nacht/Tag Temperatur betrug 16 °C/18 °C. Die Luftfeuchtigkeit lag bei 70 %.

3.3.4.1 Transfektion von *Vicia faba* durch *particle bombardment*

Für die Transfektion wurden junge *Vicia faba* Blätter ausgewählt. Das *bombardment* wurde mit dem Biolisitec® PDS-1000/He *Particle Delivery system* von Bio-Rad (München) durchgeführt. Hierfür wurden 15 µg Plasmid DNA auf 2 mg Goldpartikel (1µm Durchmesser) gefällt. Für die Fällung wurde zur DNA 50 % des Gesamtvolumens an 2,5 M CaCl₂ Lösung und 16 % des Gesamtvolumens an 0,1 M Spermidinlösung gegeben. Die Fällung erfolgte mindestens 20 min auf Eis. Nach der Fällung wurden die Goldpartikel mit 70 % und anschließend mit 100 % Ethanol gewaschen. Die gewaschenen Goldpartikel wurden in 20 µl 100 % Ethanol aufgenommen und auf den *Macrocarrier* aufgetragen. Der Beschuss erfolgte mit 650 psi. Nach dem Beschuss wurden die Blätter über Nacht dunkel und feucht inkubiert.

3.3.5 *S. cerevisiae*

Für die heterologe Expression in *S. cerevisiae* wurden verschiedene Laborstämme eingesetzt.

3.3.5.1 W303

Der W303 Wildtyp Hefestamm wurde für Lokalisationsstudien eingesetzt. Genotyp: MATa/MATα {leu2-3,112 trp1-1, can1-100, ura3-1, ade2-1, his3-11,15}[phi+] Der Hefestamm wurde freundlicherweise von Prof Dr. Adam Bertl (TU Darmstadt) zur Verfügung gestellt.

3.3.5.2 SGY1528

Im SGY 1528 Hefestamm (Tang *et al.*, 1995) wurden die Gene für die endogenen K⁺-Kanäle Trk1 und Trk2 deletiert, so dass die Hefen ohne eigenes Kaliumaufnahmesystem nicht in der Lage sind, bei millimolaren K⁺-Konzentrationen zu wachsen. Daher kann der Stamm für Komplementationstests mit heterolog exprimierten K⁺-Kanälen eingesetzt werden. Genotyp: MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15leu2-3,112 ,rp1-1 ura3-1 trk1::HIS3 trk2::TRP1. Der Hefestamm wurde von D. Minor (San Francisco) zur Verfügung gestellt.

3.3.5.3 BY4741 Δ erg6

Bei dieser Mutante des Hefestammes BY4741 ist die Delta-(24)-Sterol-C-Methyltransferase (konvertiert Zymosterol zu Fecosterol) nicht aktiv, wodurch die Ergosterolsynthese gestört ist (Xu and Nes, 1988). Dieser Stamm wurde verwendet, um die Lokalisation von Membranproteinen in Zellen mit veränderter PM Zusammensetzung zu untersuchen. Der Stamm wurde von Dr. Guido Grossmann (Universität Regensburg) bereitgestellt, Genotyp: MATa his3- Δ 1, leu2- Δ 0, met15- Δ 0, ura3- Δ 0, erg6- Δ kanMX4.

3.3.5.4 BY4741

Dieser Hefestamm entspricht dem Wildtyp des BY474.1 Δ erg6 Stamms ohne Störung der Ergosterolsynthese. Der Stamm wurde freundlicherweise von Dr. Guido Grossmann (Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt, Genotyp: MAT α his3- Δ 1, leu2- Δ 0, lys2- Δ 0, ura3- Δ 0.

3.3.5.5 Transfektion von *S. cerevisiae*

Die Laborstämme W303, SGY1528, und BY4741 wurden mit dem Frozen-EZ Yeast Transformation II™ (Zymo-Research, Orange, Kalifornien, USA) gemäß der Herstellerangaben transfiziert. Der BY4741 Δ erg6 Stamm wurde über *particle bombardment* transfiziert.

Für die Transfektion wurde abends eine 20 ml Vorkultur mit einer Kolonie beimpft, über Nacht bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Am Morgen der Transfektion wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, der Überstand verworfen und die Zellen mit sterilem ddH₂O gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml sterilem ddH₂O aufgenommen und mittig auf selektiven SD -ura Platten ausgebracht. Vor dem Beschuss wurden die Platten 5 min inkubiert, so dass sich die Hefezellen absetzen konnten. Das *bombardment* wurde mit dem Biolisitec® PDS-1000/He *Particle Delivery System* von Bio-Rad (München) durchgeführt.

Hierfür wurden 15 µg bzw. 5 µg Plamid DNA auf 2 mg Goldpartikel (1µm Durchmesser) gefällt. Für die Fällung wurde zur DNA 50 % des Gesamtvolumens an 2,5 M CaCl₂ Lösung und 16 % des Gesamtvolumens an 0,1 M Spermidin Lösung gegeben. Die Fällung erfolgte mindestens 20 min auf Eis. Nach der Fällung wurden die Goldpartikel mit 70 % und anschließend mit 100 % Ethanol gewaschen. Die gewaschenen Goldpartikel wurden in 20 µl 100 % Ethanol aufgenommen und auf den *Macrocarrier* aufgetragen. Der Beschuss erfolgte mit 900 psi.

3.3.5.6 Komplementationstest

Für den Komplementationstest wurde der Hefestamm SGY 1528 eingesetzt (Tang *et al.*, 1995), bei dem die Gene für die endogenen K⁺-Kanäle Trk1 und Trk2 deletiert sind, so dass die Hefe nur mit Hilfe von heterolog exprimierten K⁺-Kanälen in der Lage ist, auf millimolaren K⁺-Konzentrationen zu wachsen.

Mit dem SGY 1528, der den zu untersuchenden K⁺-Kanal exprimiert, wurde über Nacht eine 4 ml Vorkultur angesetzt (30 °C 220 rpm). Die Zellen wurden am nächsten Tag durch Zentrifugation geerntet, der Überstand verworfen und die Zellen zweimal in 1 ml ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde die OD₆₀₀ mit dem Nano-Drop auf ca. 1 eingestellt. Von dieser Ausgangs-Zellsuspension wurden Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 in ddH₂O hergestellt. Die Verdünnungen wurden gründlich gevortext und jeweils 7 µl nach dem in Abb. 3.1 dargestellten Muster auf Platten mit 100 mM KCl (nicht selektiv), 1 mM KCl (selektiv) und 0,5 mM KCl (selektiv) aufgetragen. Die Platten wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert.

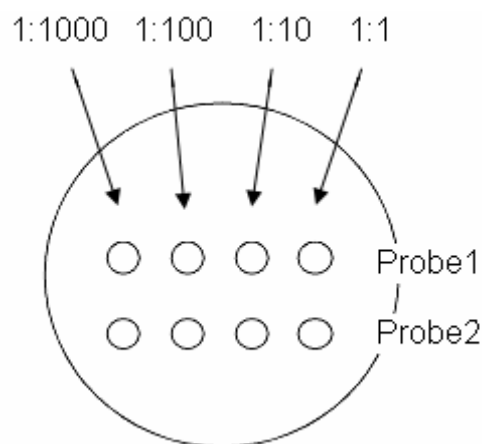


Abb. 3.1 Auftragungsmuster für den Komplementationstest

3.3.5.7 Lösungen und Nährmedien für *S. cerevisiae*

YPD-Medium:	10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Pepton 20 g/l Glukose pH auf 6,5 eingestellt und autoklaviert
YPD-Agar:	YPD-Medium mit 2 % Agar
SD -ura:	26,7 g SD-Base 0,77 g Supplement (-ura) 0,1 g Adeninsulfat Ad 1 l ddH ₂ O, dann autoklaviert
SD -ura-Platten:	SD-ura-Flüssigmedium mit KOH auf pH 5,5 eingestellt und mit 2 % Agar autoklaviert
100 mM KCl: (nicht selektive Kontrollplatten)	20 g/l Bacto-Agar 1,5 g/l Supplement (-ura/-met) 6,7 g/l Yeast Nitrogen Base (<i>without amino-acid</i>) 100 mM KCl 20 g/l Glucose pH mit TrisBase auf 6,5 eingestellt

1 mM KCl selektive Platten:	<p>15 g/l Agarose (Sigma purified Agar)</p> <p>1,5 g/l Supplement (-ura/-met)</p> <p>2,1 g/l Arginine Base</p> <p>1 mM KCl</p> <p>10 g/l Glucose</p> <p>1 mM MgSO₄</p> <p>0,1 mM CaCl₂</p> <p>0,5 ml Vitaminlösung</p> <p>0,5 ml Spurenelementlösung</p> <p>pH mit Phosphorsäure auf 6 eingestellt</p>
0,5 mM KCl selective Platten:	<p>15 g/l Agarose (Sigma purified Agar)</p> <p>1,5 g/l Supplement (-ura/-met)</p> <p>2,1 g/l Arginine Base</p> <p>0,5 mM KCl</p> <p>10 g/l Glucose</p> <p>1 mM MgSO₄</p> <p>0,1 mM CaCl₂</p> <p>0,5 ml Vitaminlösung</p> <p>0,5 ml Spurenelementlösung</p>
Spurenelementlösung (100 ml):	<p>Borsäure 0,05 g</p> <p>CuSO₄ 0,004 g</p> <p>KI 0,01 g</p> <p>FeCl₃ 0,05 g</p> <p>MnSO₄ 0,04 g</p> <p>Molybdänsäure 0,09 g</p> <p>ZnSO₄ 0,04 g</p> <p>konz. Salzsäure 1 ml</p>
Vitaminlösung (100 ml):	<p>Biotin 100x Stammlösung: 0,02 g in 100 ml</p> <p>D-Pantothensäure 0,04 g</p> <p>Nicotinsäure 0,04 g</p> <p>Pyridoxin 0,04 g</p> <p>Thiamon 0,04 g</p> <p>Inositol 0,2 g</p>

3.3.5.8 Messung des Membranpotentials mit dem Fluoreszenzindikator Bisoxonol

Für die optische Bestimmung der relativen Änderung des Membranpotentials wurde der spannungsabhängige Fluoreszenzfarbstoff Bisoxonol (Bis-(1,3-diethylthiobarbiturat)-trimethineoxonol) verwendet. Der lipophile Fluoreszenzindikator zeigt bei zunehmender Membrandepolarisation eine steigende Fluoreszenzintensität. Für die Bestimmung der relativen Membranpotentialänderung wurde die Hefezellsuspension (in 50 mM Tris pH 7) vor der spektralphotometrischen Messung mit Bisoxonol versetzt (Endkonzentration 1 μ M). Als Auslöser der Membrandepolarisation wurde die externe Kalium Konzentration schrittweise erhöht, indem jeweils 50 μ l einer 1M KCl Lösung zugegeben wurden. Die externe Kaliumkonzentration wurde damit schrittweise auf 24mM, 48 mM, 70mM, 90 mM und 110mM erhöht. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte bei $\lambda_{\text{Ex}} = 540 \text{ nm}$, die Emission wurde bei $\lambda_{\text{Em}} = 560 \text{ nm}$ detektiert.

3.3.5.9 Isolierung von Hefe-Protoplasten

Die Isolation der Hefe-Protoplasten erfolgte nach dem Protokoll von Bertel *et al.*, (1998). Für die Isolierung der Hefe-Protoplasten wurde eine 10 ml Übernachtskultur (ca. 17 h) in SD -ura angesetzt. Die Hefezellen wurden am nächsten Morgen durch Zentrifugation geernetet. (4000 rpm, 3 min). Das Zellpellet wurde in 3 ml Puffer I resuspendiert und anschließend 15 min auf dem Schüttler inkubiert (30°C, 220 rpm). Nach der Inkubation wurden 4 ml Puffer II mit 3 mg Zymolyase 20T und 100 mg BSA versetzt und zur Zellsuspension hinzugefügt. Die Zellen wurden weitere 45 min auf dem Schüttler inkubiert (30°C, 220 rpm). Anschließend wurden die Protoplasten 3 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und in 5 ml Puffer III aufgenommen.

Puffer I: 50 mM KH_2PO_4
0,2 % β -Mercaptoethanol
(nach dem Autoklavieren)
pH 7,2 (KOH)

Puffer II: 50 mM KH_2PO_4
2,4 M Sorbit
0,2 % β -Mercaptoethanol
(nach dem Autoklavieren)
pH 7,2 (KOH)

Puffer III: 220 mM KCl
 10 mM CaCl₂
 5 mM MgCl₂
 pH 7,3 (Tris-MES)

Badlösung für Hefe: 150 mM KCl
 10 mM CaCl₂
 5 mM MgCl₂
 1 mM MES mit Tris auf pH 7,5 eingestellt

3.3.5.10 Größenbestimmung der Proteincluster

Für die Bestimmung der Clustergröße wurden CLSM Aufnahmen von der Oberfläche der Hefezellen verwendet. Von diesen Aufnahmen wurde die jeweilige relative Fluoreszenzintensität für jeden Pixel ermittelt. Die ermittelten relativen Intensitäten wurden anschließend mit einer elliptischen 2D Gaußkurve gefittet (1a). Anhand der gefitten Funktion wurde der *full widths half maximum* (FWHD) Wert ermittelt, der die Größe der Cluster wiedergibt.

$$f(x,y) = z_0 + \frac{4 \ln 2}{\pi} \frac{A}{\omega^2} e^{-\left[4 \ln 2 \left(\left(\frac{(x-x_c)}{\omega \varepsilon} \right)^2 + \left(\frac{(y-y_c)}{\omega/\varepsilon} \right)^2 \right) \right]} \quad (1a)$$

z_0 = Hintergrund
 ω = FWHD
 A = integrierte Intensität
 x_c = x-Position des Maximums
 y_c = y-Position des Maximums
 ε = Elliptizität

3.4 Molekularbiologie/Plasmide

3.4.1 pEGFP-N2::KAT1::GFP:

Das Plasmid enthält ein Gen, das für eine *red shift* Variante des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) kodiert. Es besitzt einen Cytomegalovirus (CMV) 35S Promotor zur

Expression des GFP Proteins in tierischen Zellsystemen. Die Sequenz für das KAT1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde zwischen der BamHI- und der XhoI-Schnittstelle in die MCS (*multiple cloning site*) von pEGFP-N2 kloniert. Zur Selektion in *E.coli* trägt das Plasmid ein Kanamycin-Resistenz-Gen.

3.4.2 pcDNA:HCN4::GFP

Das Plasmid trägt einen *enhanced* CMV Promotor für die Expression in tierischen Zellen. Zur Selektion in *E. coli* trägt das Plasmid ein Ampicillin-Resistenz-Gen.

3.4.3 pAVA319:KAT1::GFP

Bei dem Pflanzen-Expressionsvektor pAVA319::KAT1 wurde das KAT1 Gen an der NcoI-Schnittstelle eingefügt. Das Fusionsprodukt KAT1::GFP₅ liegt unter der Kontrolle eines starken doppelten 35S *coliflower mosaic virus* Promotors. Für die Selektion in *E. coli* enthält das Plasmid ein Ampizillin-Resistenz-Gen (Hurst *et al.*, 2004).

3.4.4 pVT100-U:HUP1::GFP

Das pVT100 Plasmid kann als *shuttle* Vektor in *E. coli* und in *S. cerevisiae* amplifiziert werden. Für die Selektion in *E. coli* besitzt er ein Ampicillin-Resistenzgen und einen Uracil-Auxotrophiemarker für *S. cerevisiae*. Das 2 µ-Ori (*origin of replication*) sorgt in Hefen für eine stabile Expressionsrate. Das HUP1-codierende Gen ist C-terminal an GFP fusioniert und die Expression erfolgt unter Kontrolle eines konstitutiven ADH1-Promotors (Grossmann *et al.*, 2006). Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Guido Grossmann (Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt.

3.4.5 pYES2:KAT1::GFP

Der Ausgangsvektor pYES2 wurde freundlicherweise von Dan Minor (San Francisco) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Version des pYES2-Vektors von Invitrogen (Karlsruhe). Der Originalvektor wurde an folgenden Stellen modifiziert: die Pvu1-Schnittstelle an Position 2516 wurde entfernt und durch die Sequenz 5'-GTAGGATCG-3' ersetzt. Ebenfalls wurde die Pvu1-Schnittstelle an Position 4417 entfernt und durch die Sequenz 5'-CAACGATTGGAG-3' ersetzt. Der GAL1-Promotor wurde herausgeschnitten und durch einen Met25-Promoter ersetzt. Durch diese Veränderung wird die Expression des rekombinanten Proteins durch die Anwesenheit von Methionin reprimiert. Für die Konstruktion des pYES2:KAT1::GFP Konstrukts wurde KAT1 zwischen

die Sall- und Bam HI-Schnittstelle einkloniert. Für die Selektion in *E. coli* besitzt er ein Ampicillin-Resistenzgen und einen Uracil-Auxotrophiemarker für *S. cerevisiae*.

3.4.6 YIplac128:SUR7::mRFP und YIplac211:SUR7::GFP

Das yIplac128:SUR7::mRFP Plasmid ist ein *shuttle* Vektor für *E. coli* und *S. cerevisiae*. Der Vektor ist 3797bp groß und hat für die Selektion in *E. coli* ein Ampicillin-Resistenzgen. Für die Selektion in Hefe einen Leucin-Auxotrophiemarker. Es handelt sich um ein integratives Hefepiasmid, das vor der Transformation mit dem Restriktionsenzym Eco 521 linearisiert werden muss. Das yIplac211:SUR7::GFP Plasmid ist ebenfalls ein *shuttle* Vektor für *E. coli* und *S. cerevisiae*. Er ist 4302 bp groß. Für die Selektion in *E. coli* trägt er ebenfalls ein Ampicillin Resistenzgen. Für die Selektion in Hefe hat er jedoch einen Uracil-Auxotrophiemarker. Es handelt sich ebenfalls um ein integratives Plasmid, dass vor der Transformation mit Eco 521 linearisiert werden muss. Die Plasmide wurden von Dr. Guido Grossmann (Uni Regensburg) zur Verfügung gestellt.

3.4.7 pYEX-BX:rEAG1::yEGFP bzw. pYEX-BX:TOK1::yEGFP

Das pYEX-BX:rEAG1::yEGFP bzw. pYEX-BX:TOK1::yEGFP Plasmid ist ein *shuttle* Vektor für *E. coli* und *S. cerevisiae*. Für die Selektion in *E. coli* trägt es ein Ampicillin-Resistenzgen. Für die Selektion in Hefe hat er die Auxotrophiemarker *ura3*-und *leu2*-Synthese-Gene. Für eine optimale Verwendung in Hefe enthalten die Plasmide das yEGFP Gen (*yeast enhanced GFP*). Die Plasmide wurden von PD Dr. Adam Bertl (TU Darmstadt) bzw. PD Dr. Jost Ludwig (Physiologisch-Chemisches Institut, Tübingen) zur Verfügung gestellt.

3.4.8 Restriktionsverdau

Für die Restriktion wurde 1 µg Ausgangs-DNA in einem 20 µl Ansatz eingesetzt. Die Inkubation und Hitzeinaktivierung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.4.9 Standard-PCR

PCR-Programm:

Denaturierungsphase: 95°C, 5 min

Denaturierung: 95°C, 30 s

Anpeilung: 45-55°C, 45 s

Elongation: 68°C, Elongationszeit je nach

Fragmentgröße

Der Zyklus (Denaturierung, Annealing und

Elongation) wurde 30mal wiederholt

Elongation: 68°C, 5 min

PCR-Ansatz (50 µl):

5 µl Reaktionspuffer [10x]

3 µl Magnesiumchlorid

1 µl Plasmid-DNA Template [30 ng/µl]

1 µl Primer forward [1 pmol/µl]

1 µl Primer reverse [1 pmol/µl]

1 µl dNTP-Mix [10 mM je dNTP]

0,5 µl Taq-Polymerase

3.4.10 Ligation

Für die Ligation wurde die eingesetzte DNA-Menge mit GENTle (V1.9.4, Magnus Manske, Universität Köln) berechnet. Es wurden 200 – 500 ng Gesamt-DNA und ein Insert zu Vektor Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Für einen 10 µl Ligationsansatz wurden 0,5 µl T4-DNA Ligase und 1 µl Ligase Puffer verwendet. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur.

3.4.11 Agarosegelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Agarosegele (1 %) mit TAE-Puffer hergestellt. Als Größenstandard wurde der 1 kb Plus DNA *Ladder* (Fermentas, St Leon-Rot) verwendet.

3.4.12 Isolierung von Plasmid DNA

Plasmid DNA im Midi Maßstab wurde mit dem Präparationskit *GenElute™ High Performance Plasmid Midiprep KIT* (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Die Plasmidisolierung aus *E.coli* im MiniMaßstab erfolgte mittels *Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit* (Zymo-Research, Orange, CA USA) nach Herstellerangaben. Eluiert wurde in 30 µl ddH₂O.

3.4.13 Quantifizierung der Plasmid DNA

Die Konzentrationen wässriger DNA Lösungen wurden spektralphotometrisch anhand der Absorption von Licht bei 260 nm bestimmt (NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometer, peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

3.5 Konfokale Laser Raster Mikroskopie (CLSM)

Das CLSM ist in der Zellbiologie eine der wichtigsten Methoden für die Untersuchung an lebenden Zellen. Die CLSM Technik verbessert im Vergleich zur herkömmlichen Lichtmikroskopie die Signal zu Hintergrund Auflösung. Hierzu wird die Fluoreszenz markierte Probe nur innerhalb eines definierten Bereiches und mit Licht einer definierten Wellenlänge angeregt. Das durch die Fluorophore des Präparats emittierte Licht wird durch ein *pinhole* begrenzt, so dass nur Licht aus einer Ebene des Präparats auf den Detektor trifft und so das Streulicht aus anderen Ebenen ausblendet.

Für die Konfokalmikroskopie wurde das Leica TCS SP System (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg) eingesetzt. Das System setzt sich aus einem inversen Mikroskop (DM-IRBE), einem *continous wave* Argon-Laser mit den Wellenlängen 458, 488 und 514, sowie einem Helium-Neon-Laser mit den Wellenlängen 543 und 633 und dem Scanner (TCS NT/SP) zusammen. Die verwendeten Objektive waren das HCX PL APO 63x AN 1,2 W und das HCX PL APO 100x/1,4 NA.

Für die Lokalisationsstudien am CLSM wurden die zu untersuchenden Proteine mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen fusioniert. Für die FRAP Experimente wurden die untersuchten Proteine mit EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) fusioniert. GFP wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und zwischen 500 und 540 nm detektiert.

Für die Markierung der PM wurde der Farbstoff FM4-64 verwendet. FM4-64 ist ein amphiphiler Farbstoff, der sich an die Membran anlagert. Der Farbstoff kann nicht durch die Membran diffundieren, sondern wird nur über Endocytose aufgenommen. Er wurde mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt und zwischen 610 nm und 680 nm detektiert.

3.5.1 *Fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)

Um die laterale Beweglichkeit von Membranproteinen zu untersuchen, wird häufig die 1976 von Axelrod *et al.* entwickelte FRAP Methode angewendet.

Bei der FRAP Analyse wird in einem definierten Bereich der Probe der Fluorophor durch Belichtung mit einer hohen Intensität gebleicht. Daraufhin können fluoreszenzmarkierte Proteine aus der Umgebung wieder in den gebleichten Bereich einwandern (diffundieren), wodurch es zu einer Rückkehr der Fluoreszenz in dem gebleichten Bereich kommt. Die Rückkehr der Fluoreszenz kann über die Zeit beobachtet werden. Die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Fluoreszenzrückkehr geben Aufschluss über die laterale Beweglichkeit des untersuchten Proteins. Eine typische FRAP Kurve ist in Abb. 3.2 dargestellt.

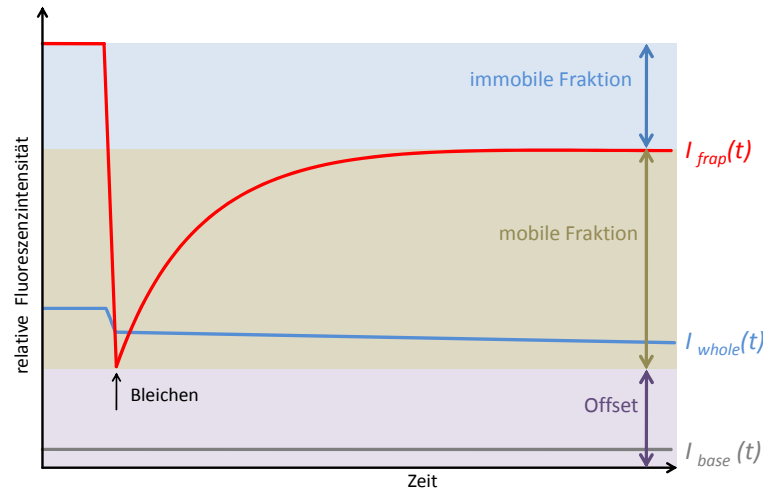


Abb. 3.2 Typischer Verlauf der Fluoreszenzintensität in einem FRAP Experiment. Die Fluoreszenzintensität aus drei ausgewählten Bereichen der Probe wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die rote Kurve zeigt die gebleichte Region vor, während und nach dem Bleichen. Die blaue Kurve zeigt den Verlauf der Fluoreszenzintensität der gesamten Zelle, die für die Korrektur des *aquisition bleaching* verwendet wird. Die graue Kurve zeigt die Fluoreszenzintensität des Hintergrunds (*base*) (Nach K. Miura, Advanced Light Microscopy Facility, EMBL Heidelberg).

Für die Analyse der FRAP Daten wurde die Fluoreszenzintensitäten aus drei Bildbereichen der Messungen verwendet (Abb. 3.2). Erstens die Fluoreszenzintensität der tatsächlich gebleichten Region (I_{frap}), zweitens die Fluoreszenzintensität des Hintergrunds (I_{base}), in der keine Fluoreszenz zu erwarten war und drittens die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der gesamten beobachteten Zelle (I_{whole}). Die Intensitäten dieser Bereiche wurden jeweils vor dem Bleichen (*pre bleach*) und nach dem Bleichen (*post bleach*) ermittelt.

Bei der FRAP Analyse kommt es bei jeder Aufnahme zu einem Bleichen der Gesamtfluoreszenzintensität über die Zeit (*aquisition bleaching*). Dies kann nachträglich korrigiert werden.

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden nach der „double normalization“ Methode (Phair *et al.*, 2004) normiert, wobei die Intensität der FRAP Region vor dem Bleichen nach Abzug der Hintergrundintensität (*base*) auf 1 gesetzt, und die FRAP Kurve um das *aquisition bleaching* korrigiert wurde (1).

$$I_{FRAPnorm}(t) = \frac{I_{FRAP}(t) - I_{Base}(t)}{I_{preFRAP} - I_{preBASE}} \cdot \frac{I_{preWHOLE} - I_{preBASE}}{I_{WHOLE}(t) - I_{BASE}(t)} \quad (1)$$

Die normierten Kurven wurden dann mit einer einfachen Exponentialfunktion (2) gefittet.

$$I(t) = r - Ae^{-kt} \quad (2)$$

Um anhand der gefitteten Exponentialfunktion die für den FRAP Verlauf charakteristischen Parameter $t_{1/2}$ (Dauer bis zum Erreichen der halbmaximalen Fluoreszenzrückkehr) und m (mobile Fraktion) besser ablesen zu können, wurde die Formel etwas umgeformt (Gleichung 7). Zur Veranschaulichung sind die verwendeten Formelzeichen auf Abb. 3.3 gezeigt.

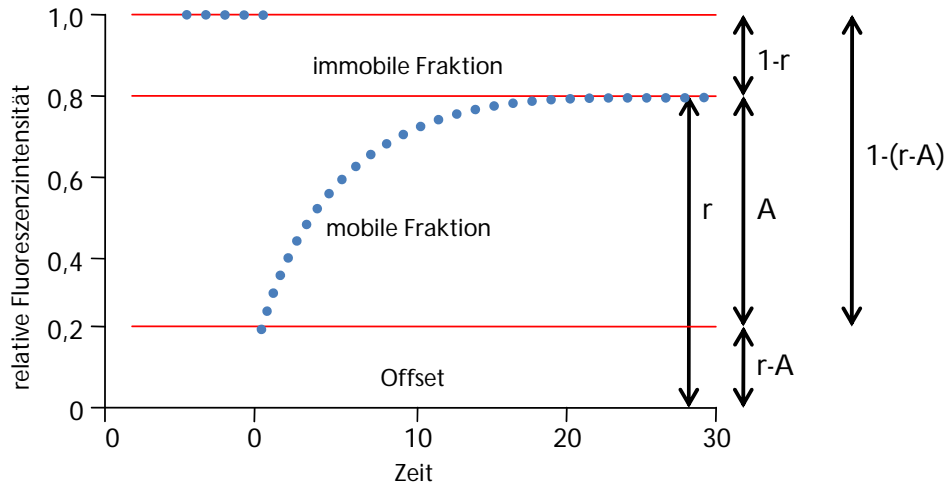


Abb. 3.3 Graphische Darstellung der verwendeten Formelzeichen. Die Spannweite der FRAP Kurve von 0 bis zum erreichten Plateau wird als r bezeichnet, die mobile Spannweite als A . Die immobile Spannweite ergibt sich als $1 - r$ und der Offset als $r - A$. Die Gesamtspannweite der FRAP Kurve ist dann $1-(r-A)$. Der Anteil der mobilen Fraktion der FRAP Kurve an der Gesamten Fraktion ergibt sich dann durch $A/(1-(r-A))$. Der Anteil der immobilen Fraktion ergibt sich durch $(1 - r) / (1 - (r - A))$.

Für die Beurteilung der Diffusionsgeschwindigkeit wird die Dauer bis zum Erreichen der halbmaximalen Fluoreszenzrückkehr $t_{1/2}$ (*half max*) verwendet. Ausgehend von einer Exponentialfunktion, ohne Offset Verschiebung auf der Y-Achse, ergibt sich für die halbmaximale Fluoreszenzrückkehr die Funktion (3)

$$0.5 = 1 - e^{-kt_{1/2}} \quad (3)$$

Nach k aufgelöst ergibt sich (4)

$$\frac{\ln 2}{t_{1/2}} = k \quad (4)$$

Die mobile Fraktion m kann, wie in Abb. 3.3 verdeutlicht, nach Normieren der Kurve und unter Berücksichtigung des Offsets durch (5) berechnet werden

$$m = \frac{A}{1 - (r - A)} \quad (5)$$

Nach A aufgelöst ergibt sich (6)

$$\frac{m(1-r)}{1-m} = A \quad (6)$$

Nun kann in die Ausgangsformel (2) für τ (4) und für A (6) eingesetzt werden. Es ergibt sich daraus die Exponentialfunktion (7), die für das Fitten der FRAP Kurven verwendet wurde, an der die Parameter m und $t_{1/2}$ direkt abgelesen werden können.

$$I(t) = r - \left(\frac{m(1-r)}{1-m} \right) \left(1 - e^{-\frac{\ln 2}{t_{1/2}} t} \right) \quad (7)$$

Für die FRAP Messungen wurde das unter Punkt 3.5 „Konfokale Laser Raster Mikroskopie (CLSM)“ beschriebene Mikroskop verwendet. Vor dem Bleichen wurde die gesamte Zelle mit ca. 30 % Laserintensität der 488 nm Argon-Krypton-Laser Linie zweimal mit dem minimalst möglichen Zeitabstand von 1,7 sec aufgenommen. Das Bleichen erfolgte in einer ausgewählten Region durch die *zoom in* Funktion und in fünf Schritten mit einer Laserintensität von ca. 100 %. Die Fluoreszenzrückkehr wurde mit einer Laserintensität von ca. 30 % detektiert. Die Aufnahmen erfolgten nach dem Bleichen alle 3, 10 oder 20 sec.

3.5.2 Software

Zur Auswertung und Analyse von Daten wurden Excel, Leica Confocal Software 2.00, LCS lite, Image J, MATLAB Student Version release 13 und OriginPro 8G verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der lateralen Mobilität von K⁺-Kanälen durch *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP)

Die FRAP Technik ermöglicht die Messung der zweidimensionalen, lateralen Beweglichkeit von fluoreszenzmarkierten Proteinen (Axelrod, 1976) und findet oft Verwendung bei der Untersuchung der Diffusion von Proteinen in zellulären Membranen (Poo, 1974). FRAP Kurven können quantitativ ausgewertet werden. Ein Beispiel für eine typische FRAP Kurve ist in Abb. 3.2 gezeigt. FRAP Kurven variieren vor allem in der Geschwindigkeit der Fluoreszenzrückkehr und in der erreichten Intensität. Die Geschwindigkeit der Fluoreszenzrückkehr wird durch den Parameter $t_{1/2}$ ausgedrückt, der sich durch die Zeit ergibt nach der die Kurve 50 % der Maximalintensität erreicht hat. Damit ist $t_{1/2}$ kleiner je schneller die Fluoreszenzrückkehr ist.

Bei den meisten FRAP Kurven erreicht die Fluoreszenzintensität nach dem Bleichen nicht mehr die Ausgangsintensität, da manche der gebleichten Fluoreszenzmoleküle immobil in der gebleichten Region verbleiben und somit nicht zur Rückkehr der Fluoreszenz beitragen. Dieser Anteil wird auch als immobile Fraktion bezeichnet, der Anteil der Moleküle der zur Rückkehr der Fluoreszenzintensität beiträgt, wird als mobile Fraktion (m) bezeichnet.

Die gemessenen FRAP Kurven wurden dann mit einer Exponentialfunktion (7) gefittet. Wie unter Abschnitt 3.5.1 beschrieben, ergeben sich daraus die charakteristischen Parameter für die laterale Mobilität der Proteine m und $t_{1/2}$.

Die Mobilität von Molekülen wird im Wesentlichen durch Diffusion, aber auch durch (chemische) Interaktion bestimmt. Die Diffusionsgeschwindigkeit des Moleküls wird wiederum durch die Größe des Moleküls, die Viskosität und die Temperatur der Umgebung charakterisiert. Weiterhin kann die Diffusion auch durch physikalische Strukturen eingeschränkt sein.

4.1.1 Laterale Mobilität des K⁺-Kanals KAT1 in der PM von *Vicia faba* Schließzellen

Zunächst wurde die laterale Mobilität des K⁺-Kanals KAT1 in pflanzlichen Zellen untersucht. Der aus *Arabidopsis thaliana* klonierte K⁺-Kanal wird, wie in Reportet-Gen-Studien an *Arabidopsis* gezeigt, hauptsächlich in Schließzellen exprimiert (Nakamura *et al.*, 1995). Für die FRAP Analyse wurde daher das sehr ähnliche, pflanzliche, heterologe Expressionssystem *Vicia faba* Schließzellen gewählt, in dem die korrekte Lokalisation und

Funktion des Kanals in der PM bereits gut untersucht ist (Hurst *et al.*, 2004). Ein Beispiel für eine FRAP Analyse an KAT1::GFP exprimierenden *Vicia faba* Schließzellen ist in Abb. 4.1 gezeigt. Für die FRAP Untersuchungen wurde die Fluoreszenzintensität vor und nach dem Bleichen in drei Bereichen analysiert.

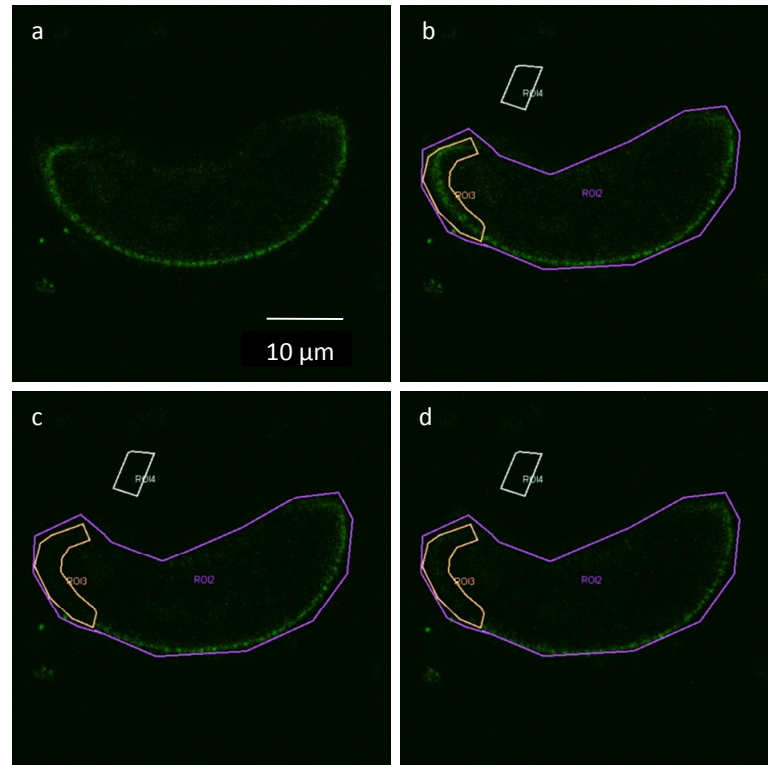


Abb. 4.1 FRAP an KAT1::GFP exprimierenden *Vicia faba* Schließzellen. Die Abbildung zeigt an einer Beispielzelle (a) die Lokalisation von KAT1::GFP in der PM, sowie die für die FRAP Untersuchung ausgewählten Bereiche (b, c, d). Die eigentliche Bleichregion ist rosa, der Bereich der gesamten Zelle ist lila und der Bereich für die Messung des Hintergrunds ist hellblau markiert. (a) und (b) zeigt die Zelle vor dem Bleichen. (c) zeigt die Zelle direkt nach dem Bleichen und (d) zeigt die Zelle am Ende der FRAP Messung.

Ein Beispiel für den Verlauf einer KAT1::GFP FRAP Kurve in *Vicia faba* Schließzellen ist in Abb. 4.2 gezeigt. Dargestellt sind die bereits auf 1 normierten und um das *aquisition bleaching* korrigierten Messwerte nach dem Bleichen (schwarze Kreise). Die rote Linie zeigt den Verlauf der mit der Exponentialfunktion (7) gefitteten Kurve.

Insgesamt war kaum eine Rückkehr der Fluoreszenz von KAT1::GFP in *Vicia faba* Schließzellen zu beobachten.

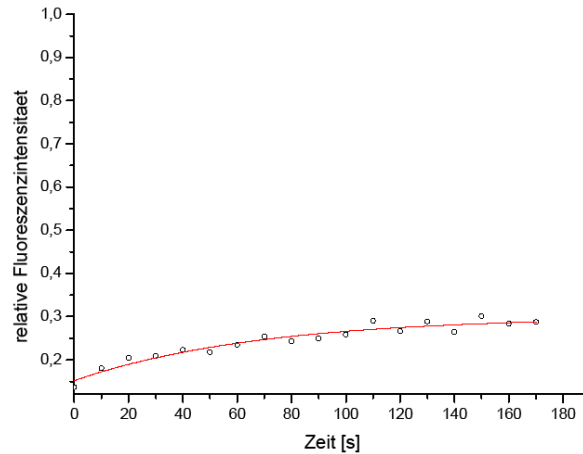


Abb. 4.2 FRAP an KAT1::GFP exprimierenden *Vicia faba* Schließzellen. Darstellung der auf 1 normierten Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen. Der mit einer Exponentialfunktion gefittete Kurvenverlauf ist rot dargestellt.

Im Mittel lag die mobile Fraktion bei 0,15. Dies besagt, dass nur 15 % der Fluoreszenzintensität, verglichen mit der Ausgangssituation in den gebleichten Bereich zurückkehren. Die kleinste ermittelte mobile Fraktion lag bei 0,09, die größte bei 0,21. Die halbmaximale Dauer der Fluoreszenzrückkehr $t_{1/2}$ lag im Mittel bei 92 s. Der geringste Wert für $t_{1/2}$ wurde mit 42 s und der höchste mit 180 s ermittelt. Die ermittelten FRAP Parameter der Messungen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

4.1.2 Laterale Mobilität des K⁺-Kanals KAT1 in der PM von HEK293 Zellen

Um die laterale Beweglichkeit von KAT1 in einem System ohne Zellwand zu untersuchen, wurde das KAT1::GFP Fusionskonstrukt heterolog in HEK293 Zellen exprimiert. Durch CLSM Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass KAT1 in HEK293 Zellen in der PM lokalisiert ist, aufgrund der starken Überexpression jedoch auch im ER und Golgiapparat der Zelle angehäuft wird. Für die FRAP Untersuchungen an der PM wurden KAT1::GFP exprimierende HEK293 Zellen ausgewählt, bei denen die Lokalisation in der PM besonders deutlich war. Ein Beispiel ist in Abb. 4.3 zu sehen.

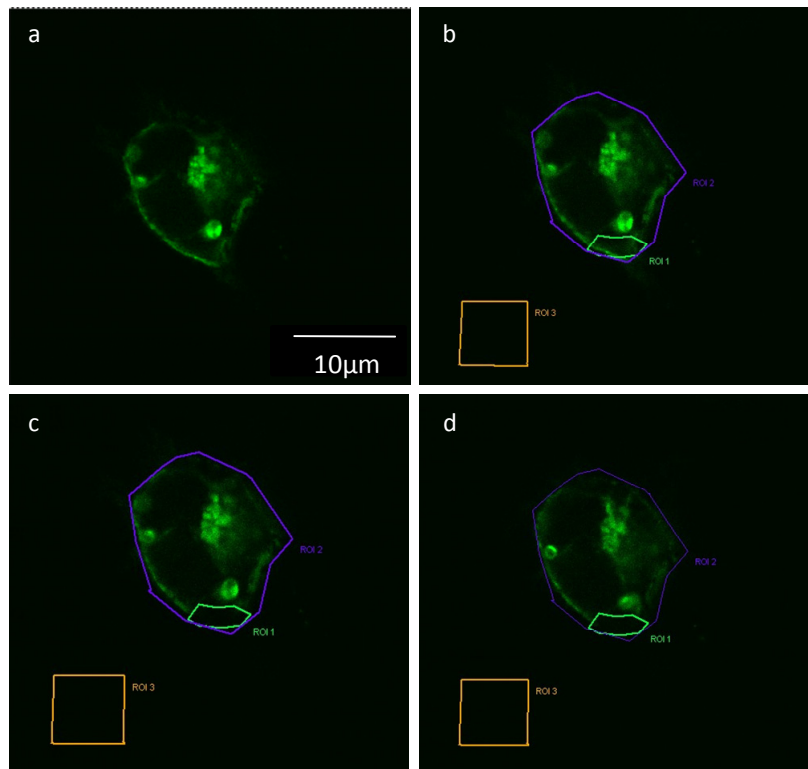


Abb. 4.3 FRAP an PM lokalisiertem KAT1::GFP in HEK293 Zellen Die Abbildung zeigt an einer Beispielzelle (a) die Lokalisation von KAT1::GFP in der PM, sowie die für die FRAP Untersuchung ausgewählten Bereiche (b, c, d). Die eigentliche Bleichregion ist grün, der Bereich der gesamten Zelle ist blau und der Bereich für die Messung des Hintergrunds ist orange markiert. (a) und (b) zeigt die Zelle vor dem Bleichen. (c) zeigt die Zelle direkt nach dem Bleichen und (d) zeigt die Zelle am Ende der FRAP Messung nach dem ein sehr geringer Teil der Fluoreszenz aus den Randregionen in den gebleichten Bereich zurückgekehrt ist.

Zwei Beispiele für den Verlauf von FRAP Kurven an KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zellen sind in Abb. 4.4 dargestellt. Es sind die bereits auf 1 normierten und um das *aquisition bleaching* korrigierten Messwerte nach dem Bleichen abgebildet. Die rote Linie zeigt den Verlauf der mit der Exponentialfunktion (7) gefitteten Kurve.

Insgesamt ist nur eine sehr geringe und langsame Rückkehr der Fluoreszenz zu beobachten. Verschiedene Messungen an jeweils unterschiedlichen KAT1 exprimierenden HEK293 Zellen ergaben eine unterschiedlich hohe Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen. Daher wurde hier jeweils ein Beispiel für eine besonders geringe (Abb. 4.4 a) und für eine etwas höhere Fluoreszenzrückkehr (Abb. 4.4 b) ausgewählt.

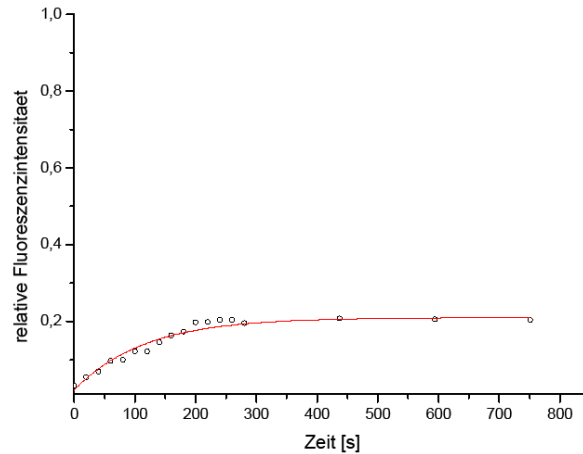
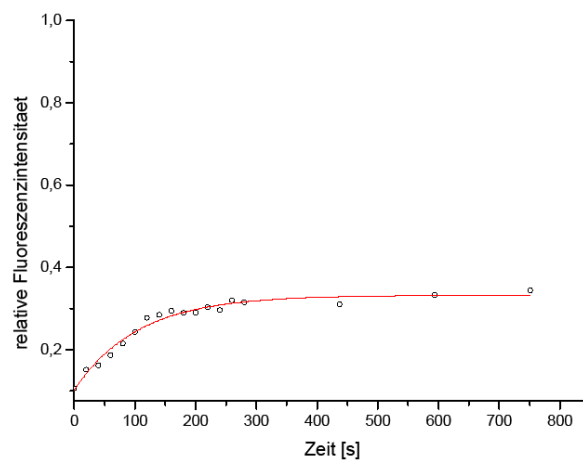
a**b**

Abb. 4.4 FRAP an KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zellen. Darstellung der auf 1 normierten Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen. Die Messpunkte sind schwarz, der mit einer Exponentialfunktion gefittete Kurvenverlauf ist rot dargestellt. (a) zeigt eine Beispielmessung für eine sehr geringe Fluoreszenzrückkehr. (b) zeigt eine Beispielmessung für eine etwas höhere Fluoreszenzrückkehr.

Für die Beurteilung von Geschwindigkeit und Ausmaß der Fluoreszenzrückkehr wurden die Parameter halbmaximalen Dauer der Fluoreszenzrückkehr $t_{1/2}$ und die mobile Fraktion m der FRAP Kurve bestimmt (Tabelle 4.1). Die mobile Fraktion, die zur eigentlichen Fluoreszenzrückkehr beiträgt, liegt im Mittel bei 0,2. Die kleinste ermittelte mobile Fraktion lag bei 0,06 die größte bei 0,34. Die halbmaximale Dauer der Fluoreszenzrückkehr $t_{1/2}$ lag im Mittel bei 65 s. Der geringste Wert für $t_{1/2}$ wurde mit 22 s und der höchste mit 127 s ermittelt.

4.1.3 Laterale Mobilität des K⁺-Kanals HCN4 in der Plasmamembran von HEK293 Zellen.

Um die FRAP Daten und die laterale Beweglichkeit des KAT1 mit einem sehr ähnlich aufgebautem Kationenkanal vergleichen zu können, wurden FRAP Untersuchungen an HCN4::GFP exprimierenden HEK293 Zellen durchgeführt. Ein Beispiel für eine HCN4::GFP exprimierende HEK293 Zelle und die für die FRAP Untersuchung ausgewählten Bereiche ist in Abb. 4.5 gezeigt.

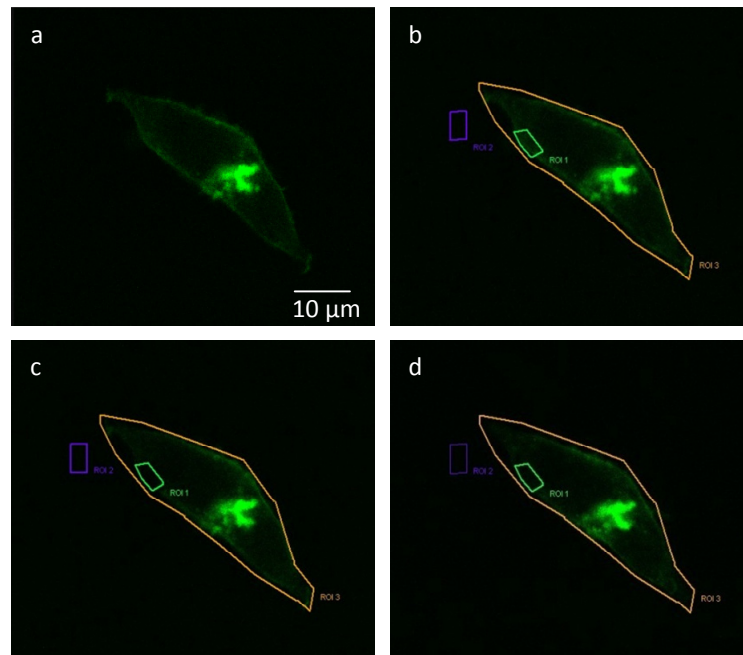


Abb. 4.5 FRAP an HCN4::GFP exprimierenden HEK293 Zellen Die Abbildung zeigt an einer Beispielszelle (a) die Lokalisation von HCN4::GFP in der Plasmamembran, sowie die für die FRAP Untersuchung ausgewählten Bereiche (b, c, d). Die eigentliche Bleichregion ist grün, der Bereich der gesamten Zelle ist orange und der Bereich für die Messung des Hintergrunds ist blau markiert. (a) zeigt die Zelle vor dem Bleichen. (c) zeigt die Zelle direkt nach dem Bleichen und (d) zeigt die Zelle am Ende der FRAP Messung nach dem ein sehr geringer Teil der Fluoreszenz aus den Randregionen in den gebleichten Bereich zurückgekehrt ist.

Der Verlauf zweier FRAP Kurven für HCN4 ist in Abb. 4.6 dargestellt. Insgesamt ist auch bei den FRAP-Untersuchungen an HCN4 kaum eine Rückkehr der Fluoreszenz zu beobachten. Verschiedene Messungen an jeweils unterschiedlichen HCN4 exprimierenden HEK293 Zellen zeigen eine unterschiedlich hohe Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen (Tabelle 4.1). Daher wurde hier jeweils ein Beispiel für eine besonders geringe (Abb. 4.6 a) und eine etwas höhere Fluoreszenzrückkehr (Abb. 4.6 b) ausgewählt.

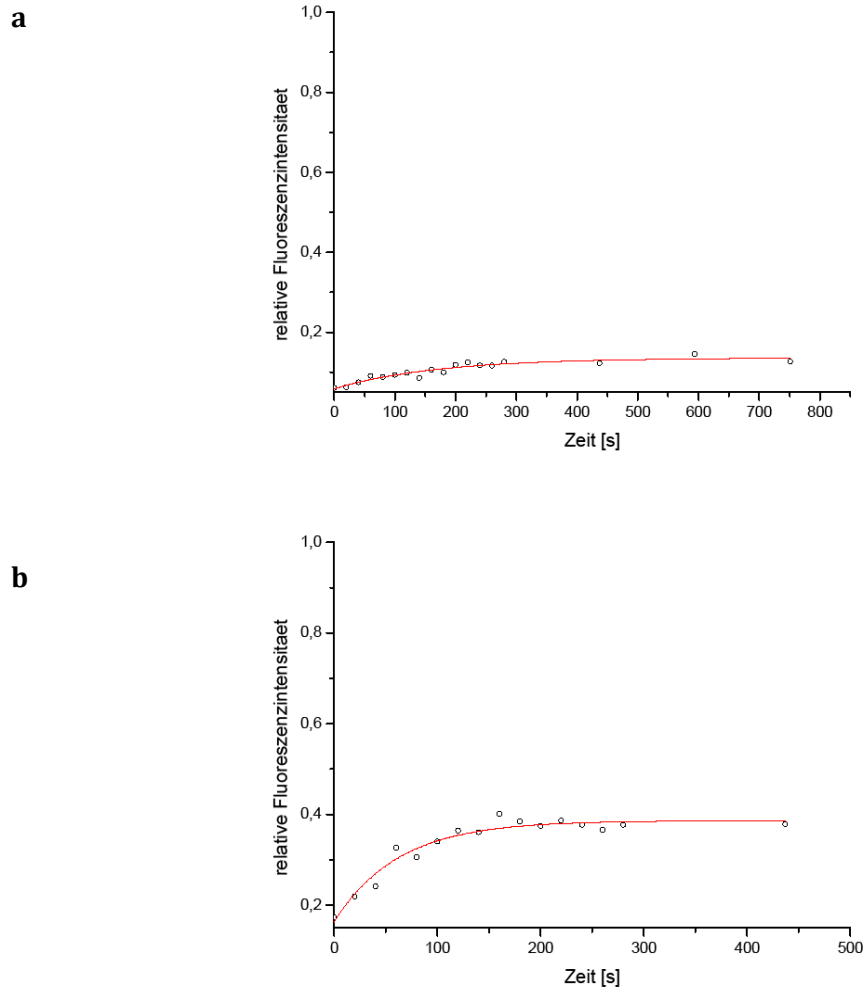


Abb. 4.6. FRAP an HCN4::GFP exprimierenden HEK293 Zellen. Darstellung der auf 1 normierten Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen. Die Messpunkte sind schwarz, der mit einer Exponentialfunktion gefittete Kurvenverlauf ist rot dargestellt. (a) zeigt eine Beispielmessung für eine sehr geringe Fluoreszenzrückkehr. (b) zeigt eine Beispielmessung für eine etwas höhere Fluoreszenzrückkehr.

Die ermittelten FRAP Parameter sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Im Mittel lag die mobile Fraktion bei 0,1, die kleinste lag bei 0,03 und die größte bei 0,26. Die halbmaximale Dauer der Fluoreszenzrückkehr $t_{1/2}$ lag im Mittel bei 58 s. Der geringste Wert für $t_{1/2}$ wurde mit 12 s und der höchste mit 152 s ermittelt.

4.1.4 Laterale Mobilität der Kanäle KAT1 und HCN4 nach Sterolverarmung der Membran durch Methyl- β -Cyclodextrin

KAT1 und HCN4 zeigen in den FRAP Untersuchungen eine sehr eingeschränkte Mobilität in der PM von HEK393 Zellen. Die Ursache hierfür ist bisher nicht bekannt. Für HCN4 wurde nachgewiesen, dass der Kanal in Mikrodomänen der Plasmamembran lokalisiert ist (Barbuti *et al.*, 2004), die sich in der Regel durch einen hohen Anteil an Sterolen auszeichnen. Für KAT1 wurde eine Lokalisation in einer *moderate detergent resistant*

membrane fraction diskutiert (Sutter *et al.*, 2006), was ebenfalls auf eine Lokalisation des Kanals in sterolhaltigen Mikrodomänen hinweist. Um zu untersuchen, ob die Lokalisation in Mikrodomänen für die geringe Beweglichkeit der Kanäle verantwortlich ist, wurde ihre Beweglichkeit nach Behandlung der Zellen mit MBCD analysiert. Von MBCD ist bekannt, dass es Sterole aus der Membran heraus löst (Yancey *et al.*, 1996). Seine Anwendung sollte daher zur Auflösung der Membrandomänen führen.

Ein Beispiel für eine FRAP Untersuchung an einer KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zelle, deren Membran zuvor durch MBCD an Sterolen verarmt wurde, ist in Abb. 4.7 gezeigt.

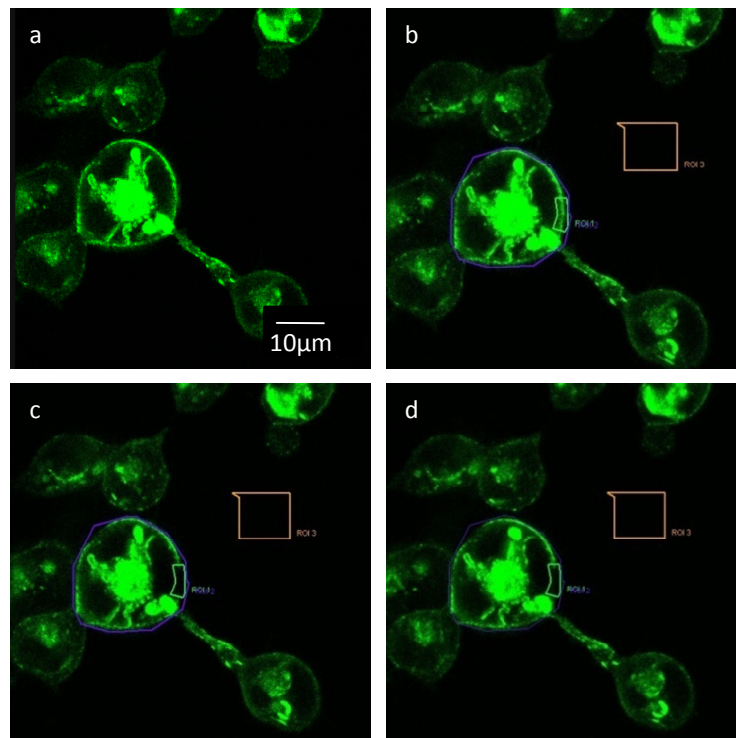


Abb. 4.7 FRAP an KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zellen, deren Membran durch MBCD an Sterolen verarmt wurde. Die Abbildung zeigt an einer Beispielzelle (a) die Lokalisation von KAT1::GFP in der Plasmamembran, sowie die für die FRAP Untersuchung ausgewählten Bereiche (b, c, d). Die eigentliche Bleichregion ist grün, der Bereich der gesamten Zelle ist blau und der Bereich für die Messung des Hintergrunds ist orange markiert. (a) Zeigt die Zelle vor dem Bleichen. (c) Zeigt die Zelle direkt nach dem Bleichen und (d) zeigt die Zelle am Ende der FRAP Messung nach dem ein sehr geringer Teil der Fluoreszenz aus den Randregionen in den gebleichten Bereich zurückgekehrt ist.

Der Verlauf einer typischen FRAP Kurve für KAT1 in MBCD behandelten Zellen ist in Abb. 4.8 zu sehen. Dargestellt sind die bereits auf 1 normierten und um das *aquisition bleaching* korrigierten Messwerte nach dem Bleichen. Die rote Linie zeigt den Verlauf der mit der Exponentialfunktion (7) gefitteten Kurve.

Auch nach der Behandlung mit MBCD ist nur eine sehr geringe Rückkehr der Fluoreszenz zu beobachten. Bei den mit MBCD behandelten Zellen ist der Anteil der mobilen Fraktion relativ konstant. Die Geschwindigkeit der Fluoreszenzrückkehr variiert hier jedoch in den gemessenen Zellen erheblich.

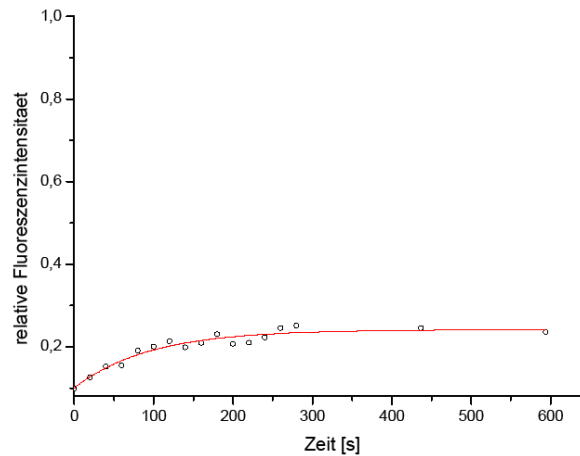


Abb. 4.8 FRAP an Methyl- β -Cyclodextrin behandelten KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zellen. Darstellung der auf 1 normierten Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen. Die Messpunkte sind schwarz, der mit einer Exponentialfunktion gefittete Kurvenverlauf ist rot dargestellt.

Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Im Mittel lag die mobile Fraktion bei 0,18, die kleinste ermittelte mobile Fraktion lag bei 0,12, die größte bei 0,25. Die halbmaximale Dauer der Fluoreszenzrückkehr $t_{1/2}$ lag im Mittel bei 80 s. Der geringste Wert für $t_{1/2}$ wurde mit 8 s und der höchste mit 138 s gemessen.

Zum Vergleich wurden auch FRAP Experimente an HCN4::GFP exprimierenden Zellen durchgeführt, deren Membran zuvor durch Methyl- β -Cyclodextrin an Sterolen verarmt wurden. Ein Beispiel ist in Abb. 4.9 gezeigt.

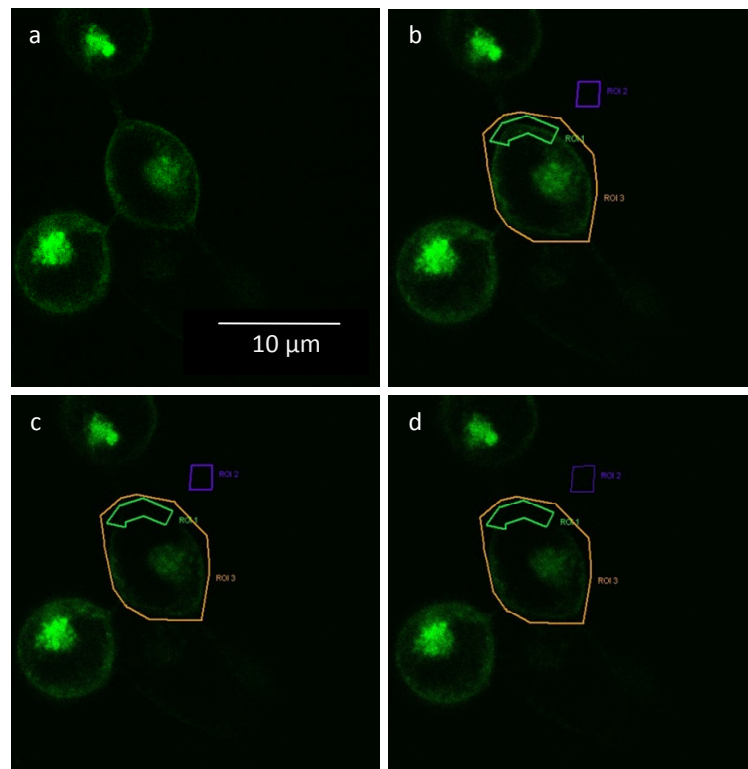


Abb. 4.9 FRAP an HCN4::GFP exprimierenden HEK293 Zellen, deren Membran durch Methyl- β -Cyclodextrin an Sterolen verarmt wurde. Die Abbildung zeigt an einer Beispielizele (a) die Lokalisation von HCN4::GFP in der Plasmamembran, sowie die für die FRAP Untersuchung ausgewählten Bereiche (b, c, d). Die eigentliche Bleichregion ist grün, der Bereich der gesamten Zelle ist orange und der Bereich für die Messung des Hintergrunds ist blau markiert. (a) zeigt die Zelle vor dem Bleichen. (c) zeigt die Zelle direkt nach dem Bleichen und (d) zeigt die Zelle am Ende der FRAP Messung nach dem ein sehr geringer Teil der Fluoreszenz aus den Randregionen in den gebleichten Bereich zurückgekehrt ist.

Der Verlauf zweier FRAP Kurven für HCN4 in Methyl- β -Cyclodextrin behandelten Zellen ist in Abb. 4.10 gezeigt. Dargestellt sind die bereits auf 1 normierten und um das *acquisition bleaching* korrigierten Messwerte nach dem Bleichen (schwarze Kreise). Die rote Linie gibt den Verlauf der mit der Exponentialfunktion (7) gefitteten Kurve an.

Auch nach der Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin ist bei HCN4, wie bei KAT1 eine sehr geringe Rückkehr der Fluoreszenz zu beobachten. Verschiedene Messungen an jeweils unterschiedlichen HCN4 exprimierenden HEK293 Zellen ergaben eine unterschiedlich hohe Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen. Daher wird hier jeweils ein Beispiel für eine besonders geringe (Abb. 4.10 a) und eine etwas höhere Fluoreszenzrückkehr (Abb. 4.10 b) gezeigt.

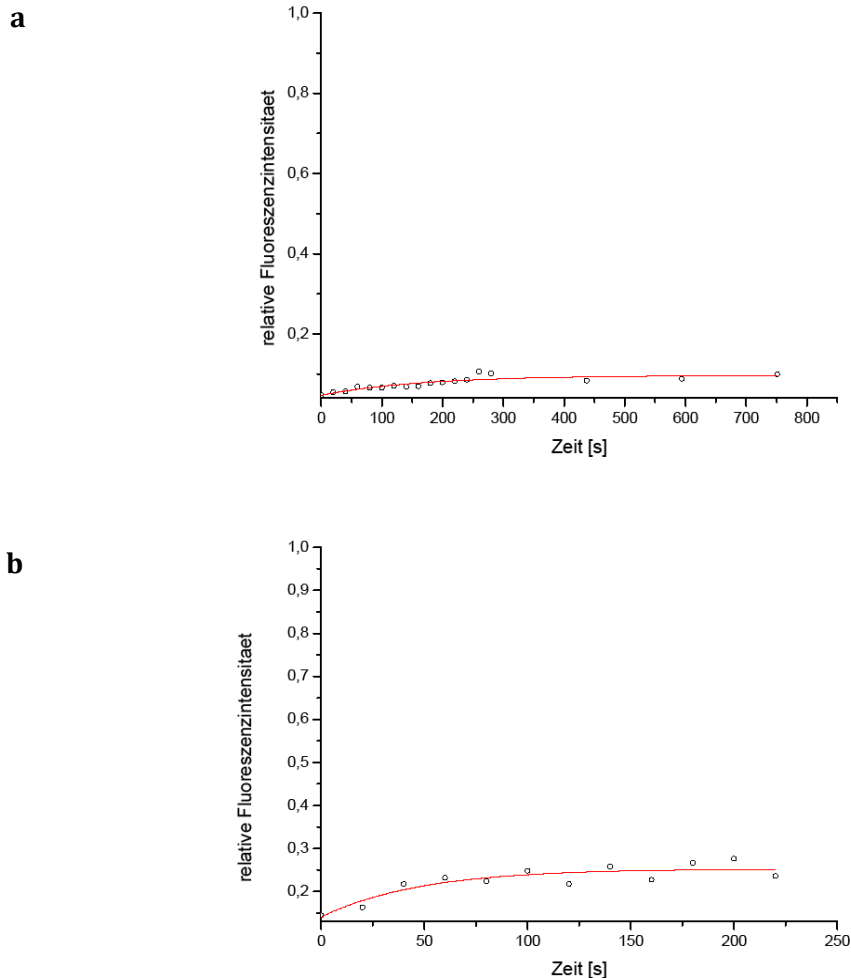


Abb. 4.10 FRAP an MBCD behandelten HCN4::GFP exprimierenden HEK293 Zellen. Darstellung der auf 1 normierten Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen. Die Messpunkte sind schwarz, der mit einer Exponentialfunktion gefittete Kurvenverlauf ist rot dargestellt. (a) zeigt eine Beispielmessung für eine sehr geringe Fluoreszenzrückkehr. (b) zeigt eine Beispielmessung für eine etwas höhere Fluoreszenzrückkehr.

Für die Beurteilung von Geschwindigkeit und Ausmaß der Fluoreszenzrückkehr wurden die Parameter $t_{1/2}$ und die mobile Fraktion m der FRAP Kurve bestimmt (Tabelle 4.1). Die mobile Fraktion, die zur eigentlichen Fluoreszenzrückkehr beiträgt, lag bei MBCD behandelten HCN4 exprimierenden Zellen im Mittel bei 0,11. Die kleinste ermittelte mobile Fraktion lag bei 0,05 die größte bei 0,2. $t_{1/2}$ lag im Mittel bei 86 s. Der geringste Wert für $t_{1/2}$ wurde mit 33 s und der höchste mit 164 s ermittelt.

4.1.5 Laterale Mobilität des KAT1 Kanals nach Latrunkulin B Behandlung

Da KAT1 auch nach der Sterolverarmung durch MBCD in FRAP Experimenten nur eine sehr eingeschränkte laterale Mobilität aufwies, wurde nun getestet, ob diese Unbeweglichkeit mit kortikalen Aktinfilamenten zusammenhängt. Dies ist besonders interessant, da für den K^+ -Einwärtsgleichrichter Kv 2.2 aus tierischen Zellen bereits

gezeigt wurde, dass er mit einem Aktin bindenden Protein assoziiert ist (Leonodakis *et al.*, 2004). Zur Untersuchung der Bedeutung von Aktin wurde vor der FRAP Untersuchung die Aktinpolymerisation in den HEK293 Zellen durch das Aktin bindende Toxin Latrunkulin B inhibiert. Ein Beispiel für FRAP an Latrunkulin B behandelten, KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zellen ist in Abb. 4.11 dargestellt.

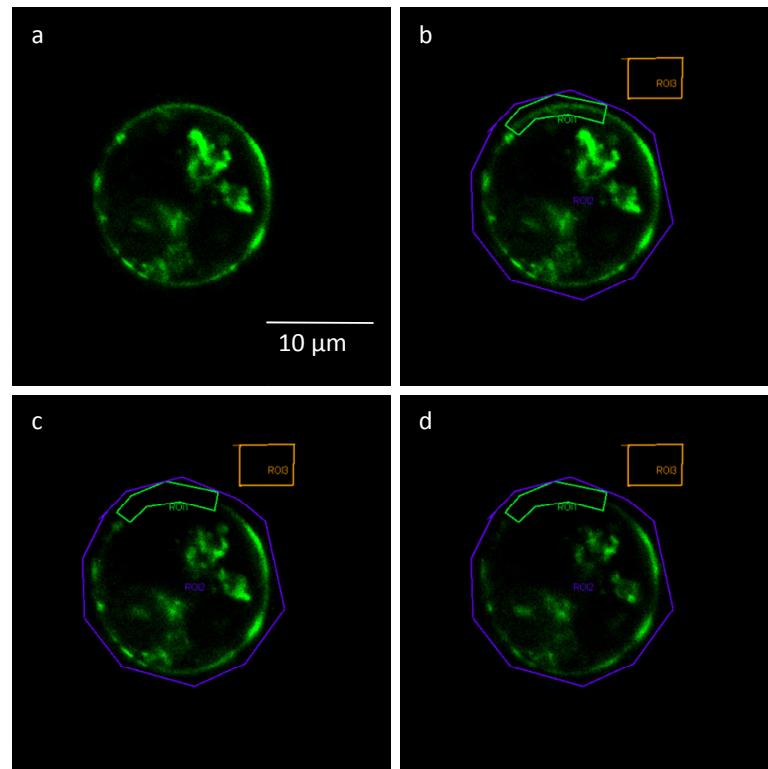


Abb. 4.11 FRAP an KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zellen, deren Aktinpolymerisation durch das Toxin Latrunkulin B inhibiert wurde. Die Abbildung zeigt an einer Beispielzelle (a) die Lokalisation von KAT1::GFP in der Plasmamembran, sowie die für die FRAP Untersuchung ausgewählten Bereiche (b, c, d). Die eigentliche Bleichregion ist grün, der Bereich der gesamten Zelle ist blau und der Bereich für die Messung des Hintergrunds ist orange markiert. (a) Zeigt die Zelle vor dem Bleichen. (c) Zeigt die Zelle direkt nach dem Bleichen und (d) zeigt die Zelle am Ende der FRAP Messung nach dem ein sehr geringer Teil der Fluoreszenz aus den Randregionen in den gebleichten Bereich zurückgekehrt ist.

Der Verlauf zweier FRAP Kurven für KAT1 in Latrunkulin B behandelten Zellen ist in Abb. 4.12 gezeigt. Dargestellt sind die bereits auf 1 normierten und um das *aquisition bleaching* korrigierten Messwerte nach dem Bleichen. Die rote Linie zeigt den Verlauf der mit der Exponentialfunktion (7) gefitteten Kurve.

Auch nach der Behandlung mit Latrunkulin B ist bei KAT1 nur eine sehr geringe Rückkehr der Fluoreszenz zu beobachten. Verschiedene Messungen an jeweils unterschiedlichen KAT1 exprimierenden HEK293 Zellen ergaben eine unterschiedlich hohe Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen. Daher wurde hier jeweils ein Beispiel für eine besonders geringe (Abb. 4.12 a) und eine etwas höhere Fluoreszenzrückkehr (Abb. 4.12 b) angegeben.

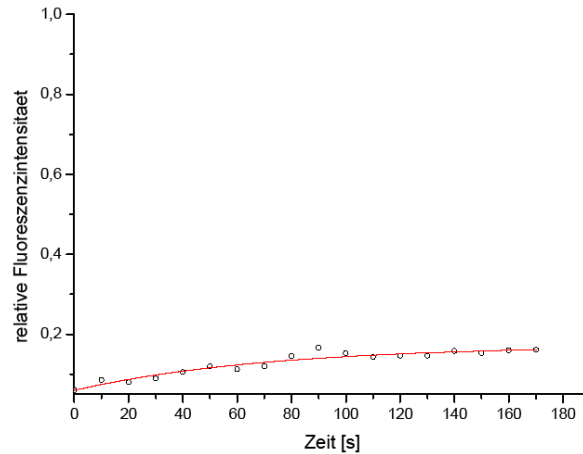
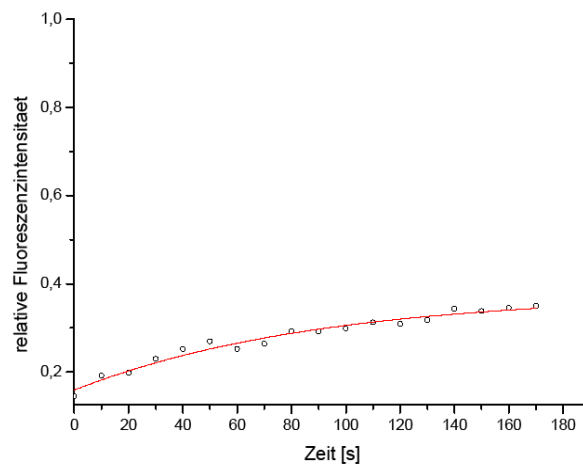
a**b**

Abb. 4.12 FRAP an Latrunkulin B behandelten, KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zellen. Darstellung der auf 1 normierten Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen. Die Messpunkte sind schwarz, der mit einer Exponentialfunktion gefittete Kurvenverlauf ist rot dargestellt. (a) zeigt eine Beispielmessung für eine sehr geringe Fluoreszenzrückkehr. (b) zeigt eine Beispielmessung für eine etwas höhere Fluoreszenzrückkehr.

Für die Beurteilung von Geschwindigkeit und Ausmaß der Fluoreszenzrückkehr wurden die Parameter $t_{1/2}$ und die mobile Fraktion m der FRAP Kurve bestimmt (Tabelle 4.1). Die mobile Fraktion lag bei Latrunkulin B behandelten, KAT1 exprimierenden Zellen im Mittel bei 0,27. Die kleinste ermittelte mobile Fraktion lag bei 0,12 die größte bei 0,66, $t_{1/2}$ lag im Mittel bei 49 s. Der geringste Wert für $t_{1/2}$ wurde mit 31 s und der höchste mit 62 s gemessen.

4.1.6 Laterale Mobilität von KAT1 im ER

Um zu testen, ob KAT1 schon im ER eine eingeschränkte Mobilität aufweist wurden auch FRAP Experimente am ER von KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zellen vorgenommen. Ein Beispiel für eine FRAP Messung am ER von KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zellen ist in Abb. 4.13 dargestellt.

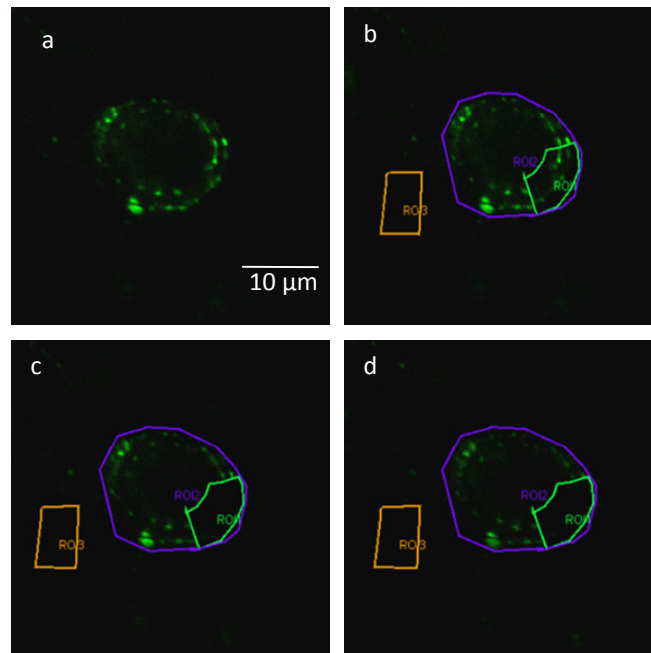


Abb. 4.13 FRAP am ER von KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zellen. Die Abbildung zeigt an einer Beispielzelle (a) die Lokalisation von KAT1::GFP im ER der Zelle, sowie die für die FRAP Untersuchung ausgewählten Bereiche (b, c, d). Die eigentliche Bleichregion ist grün, der Bereich der gesamten Zelle ist blau und der Bereich für die Messung des Hintergrunds ist orange markiert. (a) Zeigt die Zelle vor dem Bleichen. (c) Zeigt die Zelle direkt nach dem Bleichen und (d) zeigt die Zelle am Ende der FRAP Messung nach dem ein sehr geringer Teil der Fluoreszenz aus den Randregionen in den gebleichten Bereich zurückgekehrt ist.

Der Verlauf einer FRAP Kurve für ER lokalisierten KAT1 ergibt sich aus Abb. 4.14. Dargestellt sind die bereits auf 1 normierten und um das *aquisition bleaching* korrigierten Messwerte nach dem Bleichen. Die rote Linie zeigt den Verlauf der mit der Exponentialfunktion (7) gefitteten Kurve.

Nach dem Bleichen der sehr kleinen ER Domänen ist praktisch keine Rückkehr der Fluoreszenz in den gebleichte Bereich zu beobachten, wodurch die FRAP Kurve nach dem Bleichen nur sehr schwer mit einer Exponentialfunktion gefittet werden kann.

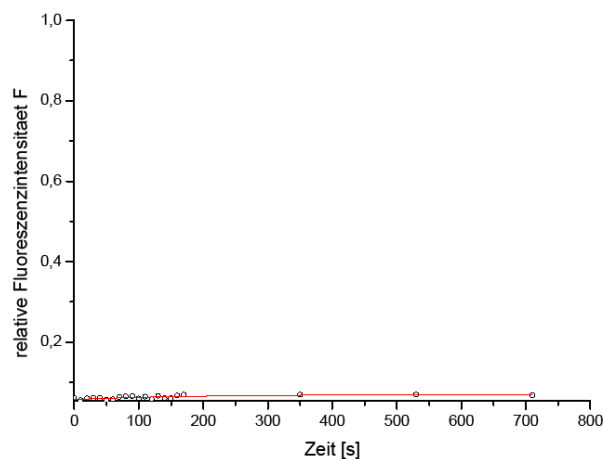


Abb. 4.14 FRAP am ER KAT1 exprimierender HEK293 Zellen. Darstellung der auf 1 normierten Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen. Die Messpunkte sind schwarz, der mit einer Exponentialfunktion gefittete Kurvenverlauf ist rot dargestellt.

Trotzdem wurden die Daten mit der Exponentialfunktion (7) gefittet, um Vergleichswerte für die Messung von KAT in der Plasmamembran zu erhalten (Tabelle 4.1).

Die mobile Fraktion, die zur eigentlichen Fluoreszenzrückkehr beiträgt, lag bei ER lokalisiertem KAT1 im Mittel bei 0,02. Die kleinste ermittelte mobile Fraktion lag bei 0,01 die größte bei 0,04. $t_{1/2}$ lag im Mittel bei 28 s. Der geringste Wert für $t_{1/2}$ wurde mit 0.3 s und der höchste mit 126 s ermittelt.

Da bei den FRAP Experimenten an KAT1 im ER praktisch keinerlei Rückkehr der Fluoreszenz zu beobachten war, wurden zum Vergleich die FRAP Experimente am ER von KAT1 exprimierenden HEK293 Zellen mit einem anderen CLSM (Leica SP_2), wiederholt. Ein Beispiel für FRAP Messungen am ER von KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zellen mit dem Leica SP_2 Mikroskop ist in Abb. 4.15 dargestellt.

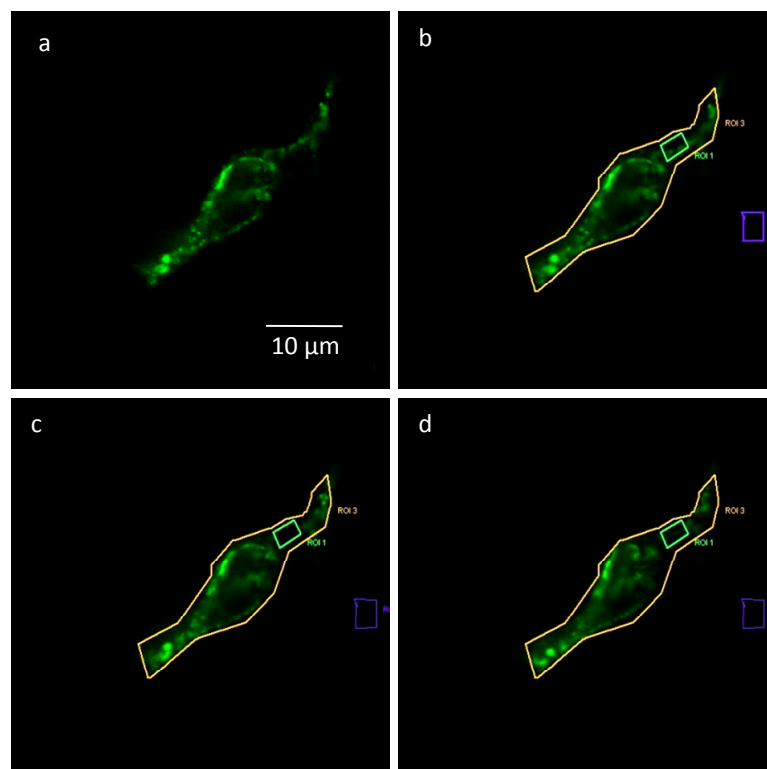


Abb. 4.15 Am SP_2 Mikroskop durchgeführte FRAP Experimente am ER von KAT1::GFP exprimierender HEK293 Zellen. Die Abbildung zeigt an einer Beispielzelle (a) die Lokalisation von KAT1::GFP im ER der Zelle, sowie die für die FRAP Untersuchung ausgewählten Bereiche (b, c, d). Die eigentliche Bleichregion ist grün, der Bereich der gesamten Zelle ist orange und der Bereich für die Messung des Hintergrunds ist blau markiert. (a) zeigt die Zelle vor dem Bleichen. (c) zeigt die Zelle direkt nach dem Bleichen und (d) zeigt die Zelle am Ende der FRAP Messung nach dem ein sehr geringer Teil der Fluoreszenz aus den Randregionen in den gebleichten Bereich zurückgekehrt ist.

Abb. 4.16 zeigt den Verlauf einer FRAP Kurve für ER lokalisierten KAT1. Dargestellt sind die bereits auf 1 normierten und um das *aquisition bleaching* korrigierten Messwerte nach dem Bleichen (schwarze Kreise). Die rote Linie zeigt den Verlauf der mit der Exponentialfunktion (7) gefitteten Kurve. Verschiedene Messungen an jeweils

unterschiedlichen HCN4 exprimierenden HEK293 Zellen zeigten eine unterschiedlich hohe Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen. Daher wurde hier jeweils ein Beispiel für eine besonders geringe (Abb. 4.16 a) und eine etwas höhere Fluoreszenzrückkehr (Abb. 4.16 b) ausgewählt.

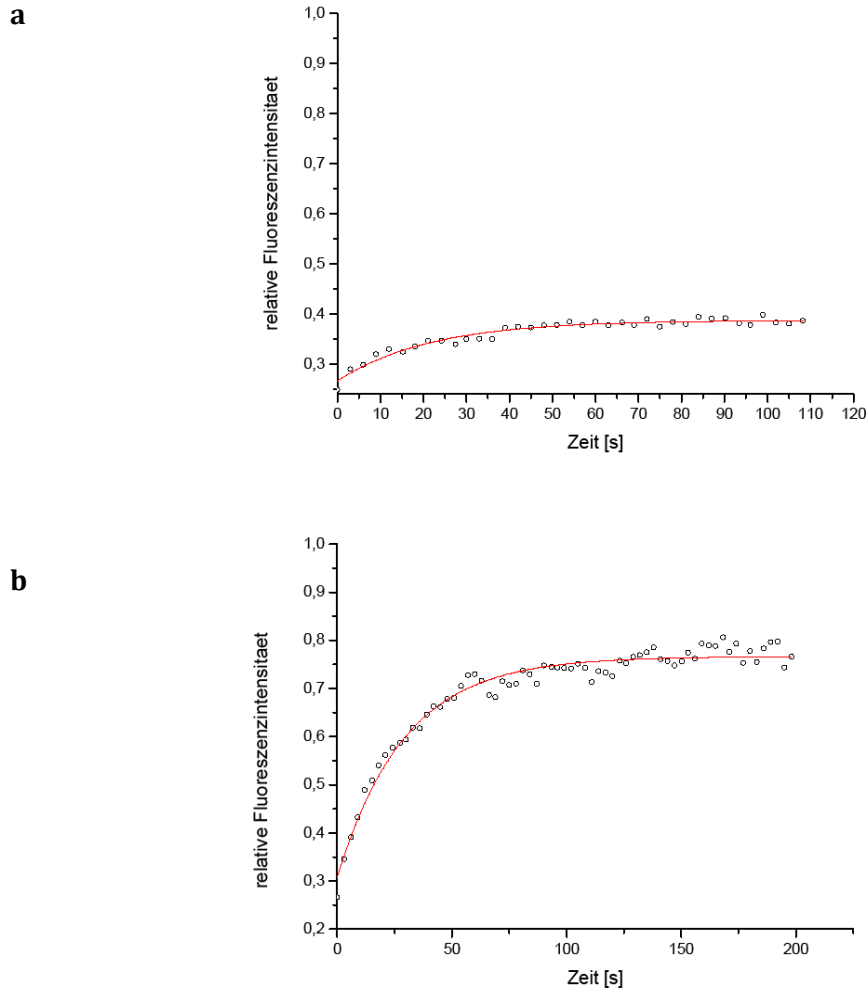


Abb. 4.16 Mit dem Leica SP_2 durchgeführter FRAP Experimente am ER KAT1 exprimierender HEK293 Zellen. Darstellung der auf 1 normierten Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen. Die Messpunkte sind schwarz, der mit einer Exponentialfunktion gefittete Kurvenverlauf ist rot dargestellt. (a) zeigt eine Beispielmessung für eine sehr geringe Fluoreszenzrückkehr. (b) zeigt eine Beispielmessung für eine etwas höhere Fluoreszenzrückkehr.

In den FRAP Experimenten mit dem SP_2 Mikroskop, verglichen mit dem SP Mikroskop, erscheint KAT1 im ER mobiler. Die mobile Fraktion, die zur eigentlichen Fluoreszenzrückkehr beiträgt, lag im Mittel bei 0,29. Die kleinste ermittelte mobile Fraktion lag bei 0,14 die größte bei 0,66. $t_{1/2}$ lag im Mittel bei 21 s. Der geringste Wert für $t_{1/2}$ wurde mit 7,6 s und der höchste mit 41 s ermittelt. Damit ist die Fluoreszenzrückkehr im ER, die mit dem SP_2 Mikroskop ermittelt wurde, ungefähr in der gleichen Größenordnung, wie die für KAT1 in der PM.

4.1.7 Zusammenfassung der FRAP Experimente

Die aus den FRAP Analysen erhaltenen Werte für die mobile Fraktion (m) und die halbmaximale Dauer der Fluoreszenzrückkehr sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die jeweiligen Mittelwerte sind außerdem in Abb. 4.17 und Abb. 4.18 graphisch dargestellt. Eine Bewertung der Daten mit dem t-Test und einem Signifikanzniveau von 5 % zeigte, dass die laterale Mobilität für KAT1 in *Vicia faba* Schließzellen ($p_m = 0,12$; $p_{t_{1/2}} = 0,41$), und in HEK293 Zellen ($p_m = 0,12$; $p_{t_{1/2}} = 0,69$) im Vergleich zu HCN4 nicht signifikant unterschiedlich waren. Ebenso war die laterale Mobilität von KAT1 in unbehandelten Zellen im Vergleich zu MBCD behandelten Zellen ($p_m = 0,52$; $p_{t_{1/2}} = 0,58$), und im Vergleich zu Latrunkulin B behandelten ($p_m = 0,39$; $p_{t_{1/2}} = 0,08$) Zellen nicht signifikant unterschiedlich.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der FRAP Experimente zur lateralen Mobilität von KAT1 und HCN4. m : mobile Fraktion, $t_{1/2}$: halbmaximalen Dauer der Fluoreszenzrückkehr, SD: Standardabweichung

	<i>Vicia faba</i> : KAT1		HEK293:KAT1		HEK293:HCN4		HEK293:KAT1 + MBCD	
	m	$t_{1/2}$ [s]	m	$t_{1/2}$ [s]	m	$t_{1/2}$ [s]	m	$t_{1/2}$ [s]
Einzelwerte	0,09	180,28	0,30	84,02	0,08	118,40	0,16	7,92
	0,22	41,80	0,19	79,67	0,03	16,19	0,22	138,12
	0,18	47,33	0,34	59,02	0,18	32,53	0,12	60,27
	0,12	47,34	0,09	127,33	0,27	152,61	0,25	126,84
	0,15	141,98	0,24	86,77	0,03	19,00	0,16	65,48
			0,28	22,06	0,09	11,85		
			0,07	58,87	0,27	47,52		
			0,16	62,28	0,18	63,62		
			0,16	53,30	0,13	60,37		
			0,12	52,23				
			0,16	37,89				
			0,32	50,80				
			0,26	72,93				
Mittelwert	0,15	91,75	0,21	65,17	0,14	58,01	0,18	79,73
SD	0,04	57,97	0,09	25,05	0,09	45,70	0,05	47,68

	HEK293:HCN4 + MBCD		HEK293:KAT1 + Latrunkulin B		HEK293:KAT1, ER, SP		HEK293:KAT1, ER, SP_2	
	m	t _{1/2} [s]	m	t _{1/2} [s]	m	t _{1/2} [s]	m	t _{1/2} [s]
Einzelwerte	0,20	164,03	0,18	51,51	0,04	2,89	0,19	26,72
	0,13	33,18	0,32	30,78	0,01	0,27	0,15	24,96
	0,05	115,12	0,15	53,89	0,01	3,31	0,34	22,67
	0,09	54,63	0,12	49,77	0,01	61,17	0,20	41,26
	0,13	91,00	0,66	60,48	0,01	126,10	0,17	14,91
	0,07	58,26	0,21	38,03	0,04	17,95	0,23	16,46
			0,26	62,24	0,02	6,85	0,46	14,04
					0,02	9,64	0,66	20,36
							0,22	34,39
							0,29	14,07
							0,24	28,55
							0,45	17,07
							0,38	7,65
							0,16	18,99
							0,24	14,51
Mittelwert	0,11	86,04	0,27	49,53	0,02	28,52	0,29	21,11
SD	0,05	43,79	0,17	10,61	0,01	41,25	0,14	8,53

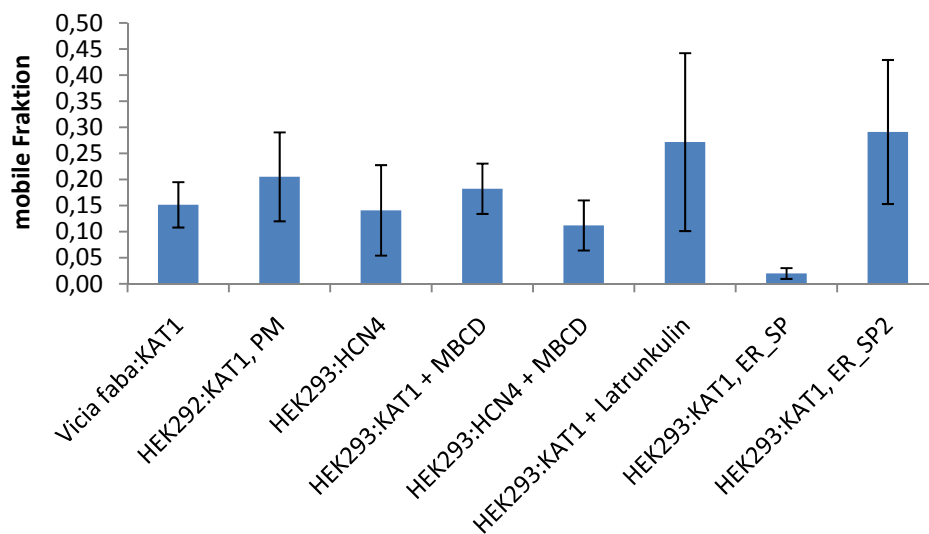


Abb. 4.17 Darstellung der in den FRAP Untersuchungen ermittelten mobilen Fraktion m. Es wurde jeweils der Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung aufgetragen.

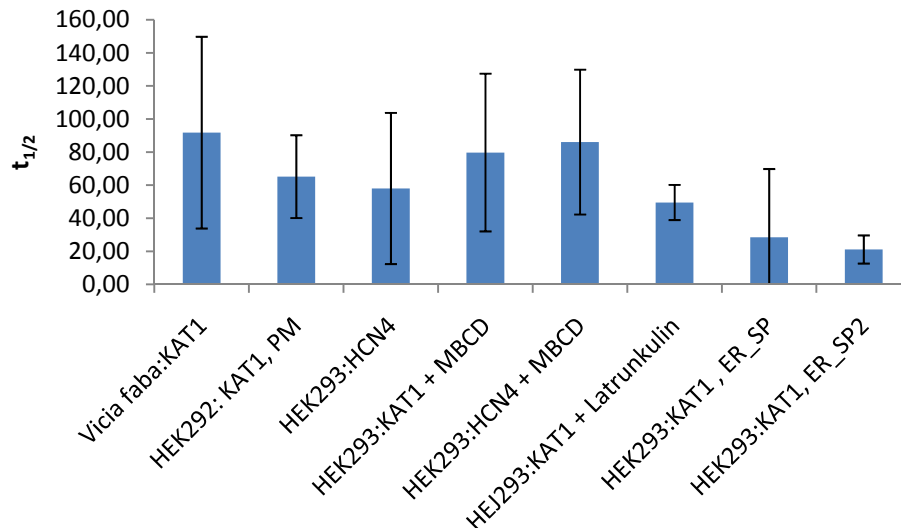


Abb. 4.18 Darstellung der in den FRAP Untersuchungen ermittelten $t_{1/2}$ Werte. Es wurde jeweils der Mittelwert mit der entsprechenden Standard Abweichung aufgetragen.

4.2 Lokalisation von Membranproteinen innerhalb der PM

4.2.1 Räumliche Anordnung von KAT1 in der PM

Wie bereits in mehreren Vorarbeiten beschrieben, zeigt der K^+ -Kanal KAT1 eine auffallende Anordnung in Clustern innerhalb der PM. Wird der Kanal heterolog in *Vicia faba* Schließzellen exprimiert zeigt KAT1 eine Anordnung in Clustern, die sich wiederum zu radiären Streifen zusammenlagern. In Epidermiszellen weist der Kanal eine Lokalisation in gleichmäßig verteilten Clustern in der PM auf (Homann *et al.*, 2007). Die Anordnung von KAT1 in Clustern wurde auch in zellwandlosen Protoplasten von *Vicia faba* Schließzellen beobachtet (Hurst *et al.*, 2004). Eine punktförmige Anordnung von KAT1 in der PM ergibt sich ebenfalls in intakten Tabak Epidermiszellen und Protoplasten (Sutter *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die punktförmige Anordnung des pflanzlichen K^+ -Kanals KAT1 nicht nur in pflanzlichen Expressionssystemen, sondern auch in tierischen Zellen in Clustern innerhalb der PM vorliegt. Die typische Verteilung des Kanals in CHO-K1 und HEK293 Zellen ist in Abb. 4.19 dargestellt.

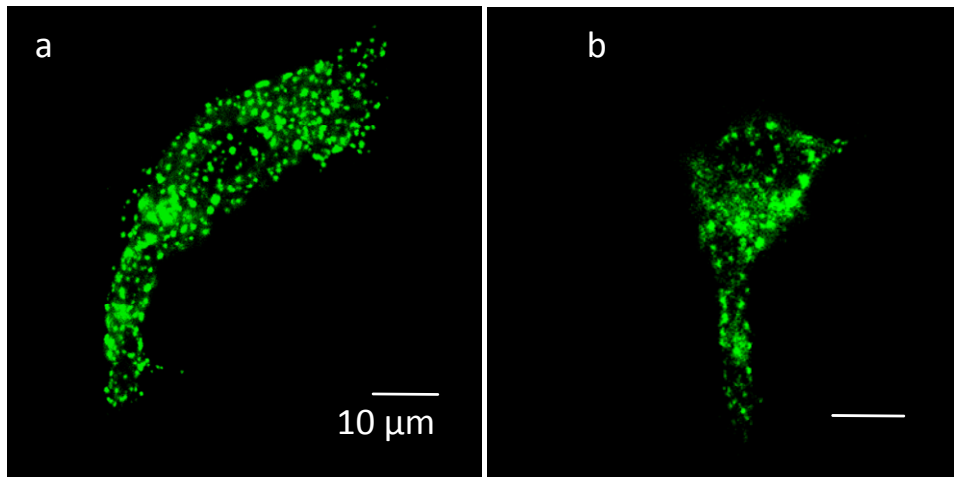


Abb. 4.19 Anordnung des KAT1::GFP in CHO-K1 und HEK293 Zellen. (a) Maximalprojektion einer KAT1::GFP exprimierenden CHO-K1 Zelle. (b) Maximalprojektion einer KAT1::GFP exprimierenden HEK293 Zelle.

Ein Vergleich der Verteilung des pflanzlichen K⁺-Kanals KAT1 mit dem sehr ähnlich aufgebauten, tierischen Kationenkanal HCN4 zeigt, dass auch dieser Kanal in Clustern innerhalb der PM vorliegt (siehe Abb. 4.20). Interessant ist dies vor allem deshalb, weil für HCN4 bereits beschrieben wurde, dass er in Membranmikrodomänen vorliegt. (Barbuti *et al.*, 2004).

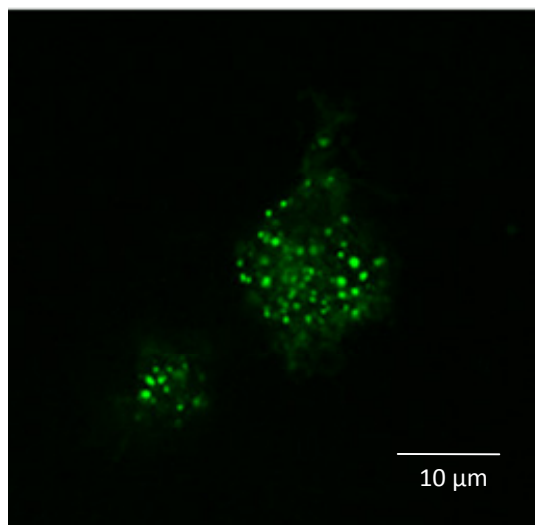


Abb. 4.20 Lokalisation des tierischen K⁺-Kanals HCN4 ebenfalls in HEK293 Zellen. Maximalprojektion einer HCN4::GFP exprimierenden HEK293 Zelle.

4.2.1.1 Abhängigkeit der KAT1 Lokalisation in HEK293 Zellen von Sterolen

Für den tierischen K⁺-Kanal Kv 2.1 konnte nachgewiesen werden, dass sich die Größe der Cluster nach Behandlung der Zelle mit MBCD ändert. In unbehandelten Zellen hatten die Kv 2.1 Cluster eine Größe von 1,4 bis 1,8 μm. Nach der MBCD Behandlung waren die Cluster 3,8 bis 6 μm groß (O. Connel und Tamakun, 2005). Daher war zu prüfen, ob auch

die Lokalisation von KAT1 ebenso durch MBCD zu beeinflussen ist und ob die KAT1 Lokalisation von Sterolen in der PM abhängig ist. Eine typische Verteilung von KAT1::GFP in der PM vor und nach der Sterolverarmung zeigt Abb. 4.21. Bei einem qualitativen Vergleich der Lokalisation vor und nach der Sterolverarmung entsteht der Eindruck, dass KAT1 nach der Sterolverarmung homogener über die PM verteilt ist. Allerdings ist KAT1::GFP in HEK293 Zellen nicht nur in der PM, sondern auch im Inneren der Zelle in Kompartimenten des Endomembransystems lokalisiert. Dabei ist es problematisch, die Cluster in der PM von den intrazellulären Strukturen zu unterscheiden. Außerdem wiesen die mit MBCD behandelten Zellen nur noch eine sehr schwache Fluoreszenzintensität auf, wodurch die Cluster nicht gut gegeneinander abgegrenzt werden konnten. Dadurch war eine quantitative Auswertung der Veränderung der Cluster nicht möglich.

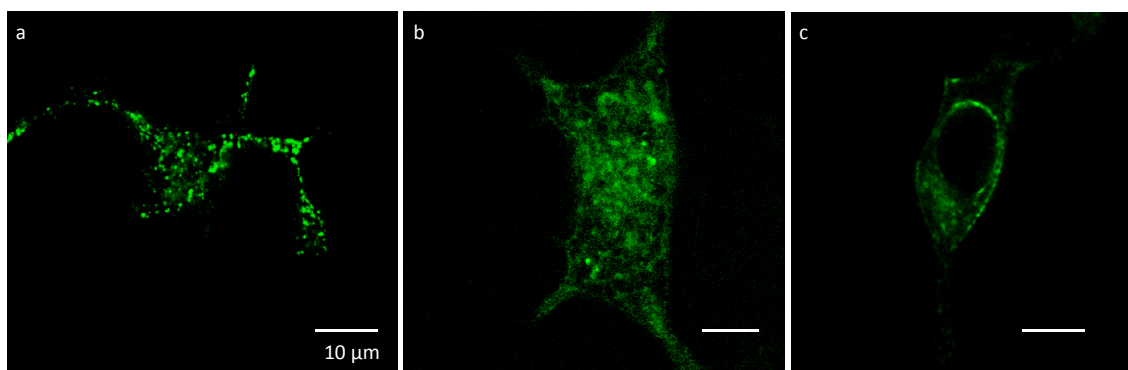


Abb. 4.21 Lokalisation von KAT1::GFP vor und nach der Sterolverarmung mit MBCD in HEK293 Zellen. (a) Maximalprojektion einer KAT1::GFP exprimierenden Zelle ohne Sterolverarmung. (b) und (c) Beispiele für eine KAT1 exprimierende HEK293 Zellen nach der Sterolverarmung.

4.3 Lokalisationsstudien von KAT1 in *S. cerevisiae*

Als weiteres Modellsystem zur Untersuchung der Faktoren, die die Clusterbildung von KAT1 induzieren oder aufrechterhalten, wurde *S. cerevisiae* gewählt. *S. cerevisiae* eignet sich als Modellorganismus für die Untersuchung von PM-Mikrodomänen besonders, da hier diese Mikrodomänen bereits sehr gut charakterisiert sind. Für die Charakterisierung des KAT1 in Hefe wurde das KAT1 Gen in den pYES2 Vektor kloniert.

4.3.1 Expression von KAT1 in *S. cerevisiae*

Obwohl *S. cerevisiae* ein weit verbreiteter Modellorganismus für die Expression von heterologen Proteinen ist, kann es vor allem bei Membranproteinen oft zu einer veränderten Faltung des Proteins oder zu einer fehlerhaften Sortierung innerhalb der Zelle kommen. Dies beruht unter anderem auf der leicht unterschiedlichen Membranzusammensetzung von Hefen im Vergleich zum homologen Expressionssystem und der damit einhergehenden veränderten Lipid-Protein-Interaktion (Opekarová und

Tanner, 2003). Daher war es wichtig zu überprüfen, ob das KAT1::GFP Fusionsprotein bei einer Expression in *S. cerevisiae* korrekt zur PM transportiert und dort auch richtig gefaltet und eingebaut wird. Für den Beweis der richtigen Sortierung und Funktionalität des Kanals an der PM wurde deshalb ein Komplementationstest durchgeführt.

4.3.1.1 Nachweis der Funktionalität des KAT1::GFP in *S. cerevisiae* durch den Komplementationstest

Für den Komplementationstest wurde der Hefestamm SGY1528 verwendet, bei dem die endogenen K⁺-Transporter TRK1 und TRK2 deletiert sind. Durch diese Deletion können die Hefen des Stamms SGY1528 (Tang *et al.*, 1995) nur mit sehr hohen Konzentrationen an KCl (100 mM) im Nährmedium überleben. Für ein Wachstum auf Medien mit niedrigeren KCl-Konzentrationen (1 mM und 0,5 mM) muss der Hefestamm einen heterologen K⁺-Kanal exprimieren, der die Deletion des eigenen Kalium-Aufnahmesystems komplementiert bzw. rettet.

Der Komplementationstest mit dem K⁺-Kanal KAT1::GFP in SGY1528 ist in Abb. 4.22 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde der K⁺-Kanal Kcv (K⁺-Kanal *Chlorella Virus*) aus dem Virus PBCV-1 (*Paramecium bursaria Chlorella Virus-1*) verwendet, von dem bereits bekannt ist, dass er die Kaliumaufnahme des SGY1528 komplementiert (Balß, 2007). Als Negativkontrolle wurde der Kesv Kanal verwendet, der den SGY1528 nicht komplementieren kann, weil er statt in der PM in den Mitochondrien lokalisiert ist.

Auf der nicht selektiven Platte mit einer KCl-Konzentration von 100 mM können auch die Zellen wachsen, die keinen funktionalen K⁺-Kanal exprimieren. Daran ist zu sehen, dass alle für den Test verwendeten Zellen prinzipiell wachstumsfähig sind. Auf den Platten mit 1 mM und 0,5 mM KCl können nur die Zellen mit funktionalem K⁺-Kanal wachsen. Wie in Abb. 4.22 zu sehen ist, wachsen Zellen, die den KAT1::GFP exprimieren sehr gut auf den selektiven Platten. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass KAT1::GFP richtig zur PM transportiert wird und dort auch funktional vorliegt.

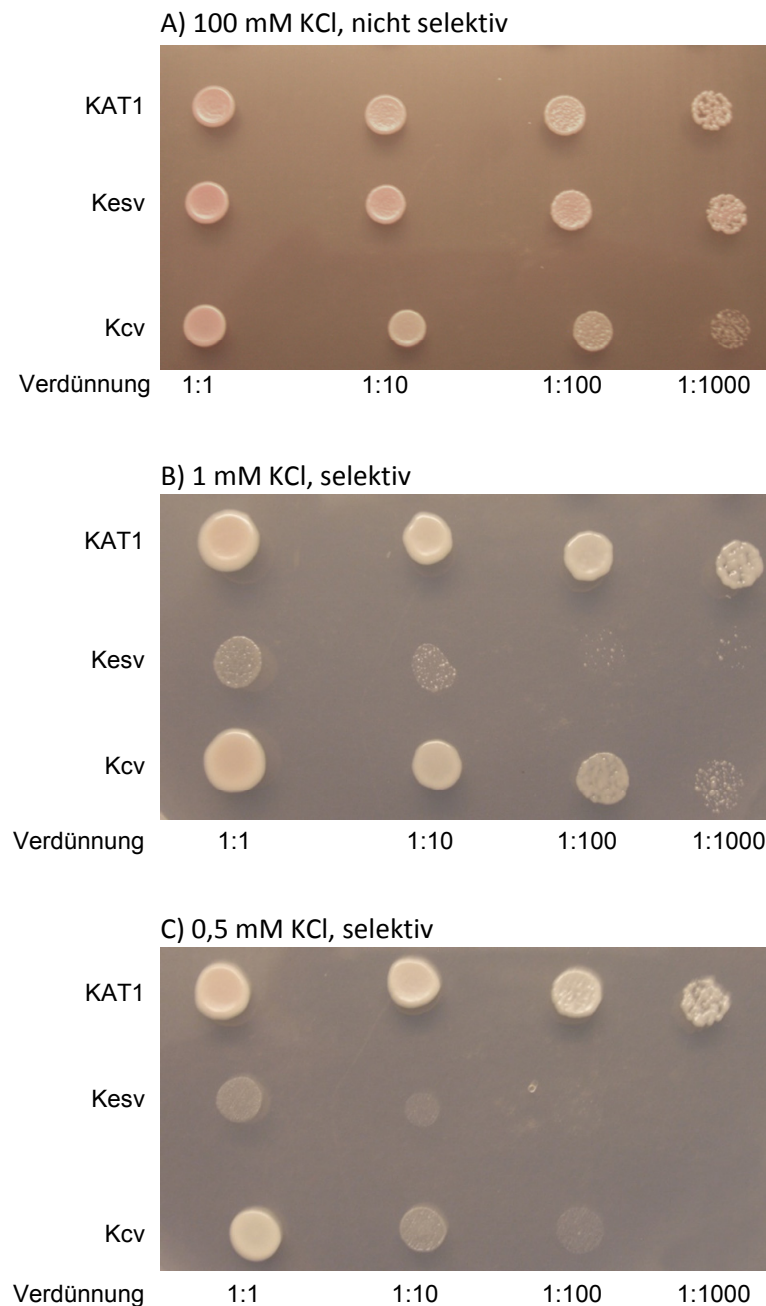


Abb. 4.22 Komplementationstest des SGY1528-Stammes mit KAT1::GFP im Vergleich zu Kesv (Negativkontrolle) und Kcv (Positivkontrolle) auf 100 mM KCl nicht selektiven Platten in den jeweils angegebenen Verdünnungen. (A) Wachstum auf 100 mM KCl nicht selektiver Platte. (B) Wachstum auf 1 mM KCl selektiver Platte. (C) Wachstum auf 0,5 mM KCl selektiver Platte.

4.3.1.2 Anordnung des KAT1 in der PM von *S. cerevisiae* und Vergleich zur Lokalisation anderer Membranproteine /Kanäle in der PM

Für die Lokalisationsstudien wurden verschiedene mit GFP bzw. mRFP fusionierte Membranproteine in Hefe exprimiert und ihre Anordnung in der PM mit dem CLSM untersucht.

4.3.1.2.1 Anordnung von KAT1::GFP in der PM

Bei einer heterologen Expression des in dieser Arbeit schwerpunktmäßig untersuchten KAT1::GFP Proteins in *S. cerevisiae* zeigt sich ebenfalls, wie in pflanzlichen Zellen (Hurst *et al.*, 2004; Sutter *et al.*, 2006; Homann *et al.*, 2007) und tierischen Zellen (siehe Abschnitt 3.2.1) eine Anordnung des Kanals in Clustern innerhalb der PM. Die typische Verteilung des KAT1::GFP Proteins in der PM ist in Abb. 4.23 dargestellt. Das KAT1::GFP Protein liegt in Clustern in der PM vor, jedoch ist auch ein Teil des Proteins in Endomembran-Kompartimenten innerhalb der Zelle zu sehen.

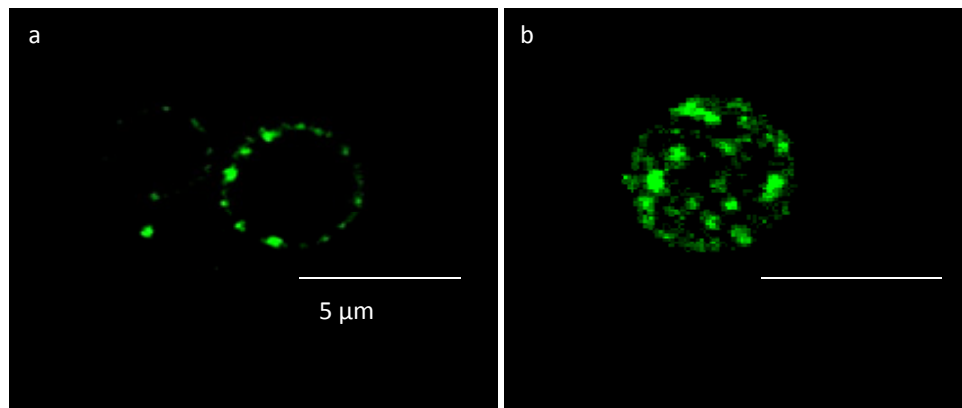


Abb. 4.23 Anordnung von KAT1::GFP in Clustern in der PM von *S. cerevisiae*. (a) CLSM Aufnahme eines optischen Schnitts durch die Hefezelle zeigt die Cluster von KAT1::GFP in der PM. (b) Maximalprojektion von aufeinanderfolgenden Schnitten zeigt die räumliche Anordnung von KAT1::GFP in Clustern in der PM der gesamten Zelle.

4.3.1.2.2 Anordnung weiterer Kanäle und Transporter in *S. cerevisiae*

Um zu überprüfen, ob heterolog in *S. cerevisiae* exprimierte Membranproteine immer in Clustern in der PM vorliegen, wurde die Anordnung folgender Kanäle und Transporter untersucht.

- TOK1::GFP
- rEAG1::GFP
- HUP1::GFP

Die typische homogene Lokalisation des K⁺-Kanals TOK1 (*two pore regions containing outward rectifying K⁺ channel*) aus *S. cerevisiae* ist in Abb. 4.24 zu sehen. Die homogene Verteilung des Kanals über die PM der Zelle zeigt, dass nicht alle K⁺-Kanäle in Clustern innerhalb der PM vorliegen.

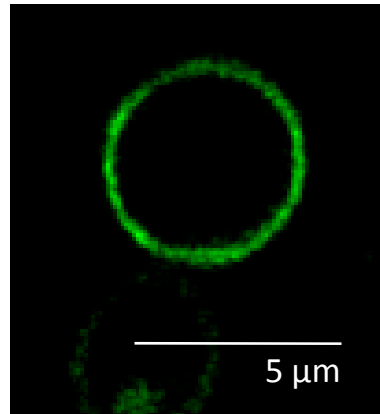


Abb. 4.24 Homogene Verteilung des TOK1 K⁺Kanals in *S. cerevisiae*. CLSM Aufnahme eines optischen Schnitts durch eine TOK1 exprimierende Zelle.

Neben TOK1 wurde die Verteilung des KAT1 in der PM auch mit dem Membranprotein HUP1 (*hexose uptake protein*) aus *Chlorella kessleri*, einem Glukose-Protonen-Syporter, und dem neuronalen spannungsaktivierten, auswärtsgleichrichtenden K⁺-Kanal der Ratte rEAG1 (*rat Ether-à-go-go*) verglichen. Auch HUP1 und rEAG1 sind homogen in der PM verteilt. Eine Clusterbildung erfolgt bei diesen beiden Proteinen bei einer hohen Osmolarität des Mediums. Auf diese Besonderheit wird in Abschnitt 4.4.2 eingegangen. Die typische Lokalisation des rEAG1 und HUP1 ist in Abb. 4.25 und Abb. 4.26 wiedergegeben.

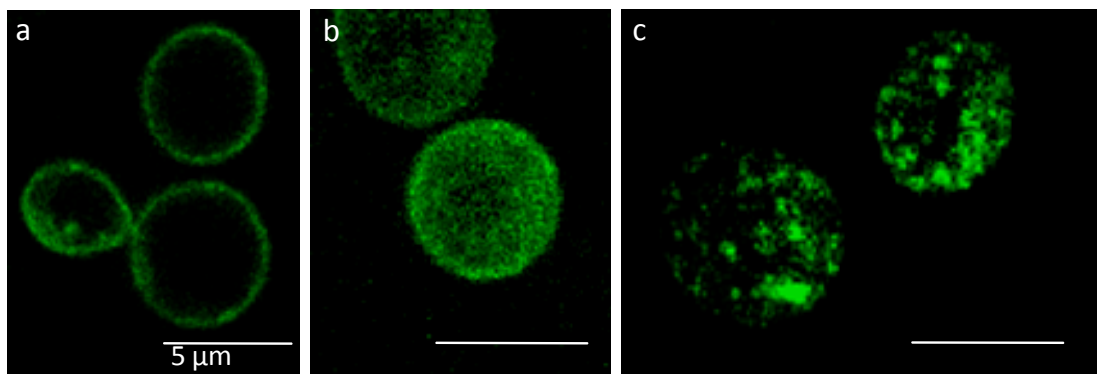


Abb. 4.25 Homogene Verteilung des rEAG1::GFP K⁺-Kanals und Lokalisation in Clustern in der PM von *S. cerevisiae*. (a) CLSM Aufnahme eines optischen Schnitts durch eine rEAG1::GFP exprimierende Zelle zeigt die homogene Verteilung des Kanal (Zellen vor Mikroskopie in ddH₂O aufgenommen). (b) Maximalprojektion einer rEAG1::GFP exprimierenden Zelle in ddH₂O. (c) Maximalprojektion einer rEAG1::GFP exprimierenden Zelle in 1M Sorbitollösung (1,5 osmol/kg) zeigt eine Anordnung von rEAG1::GFP in Clustern.

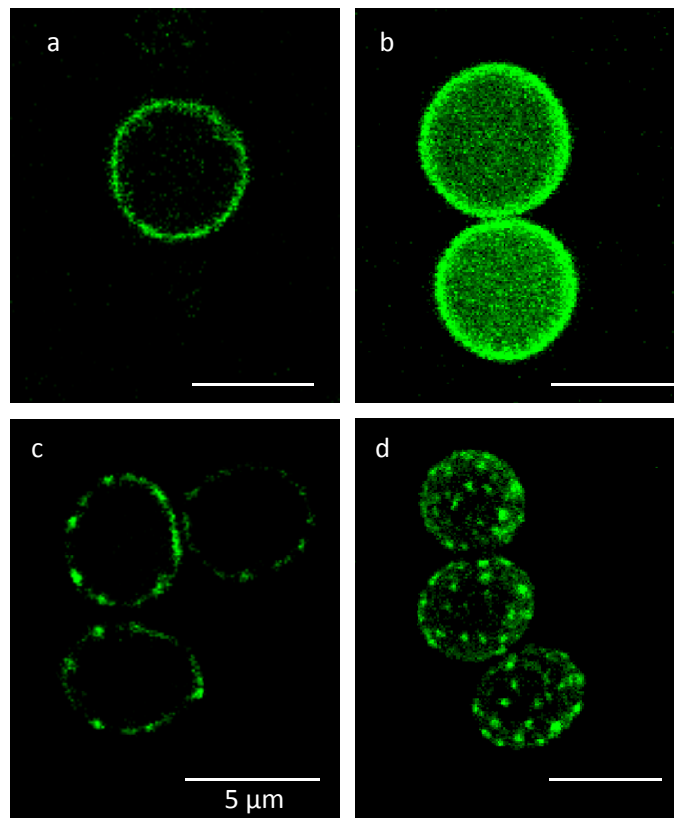


Abb. 4.26 Homogene Verteilung des Hexose Symporters HUP1::GFP und Lokalisation in Clustern in der PM von *S. cerevisiae*. (a) Optischer Schnitt durch eine HUP1::GFP exprimierende Zelle in YPD Medium mit 0,2 % Glukose (0,159 osmol/kg). (b) Maximalprojektion einer HUP1::GFP exprimierenden Zelle in YPD mit 0,2 % Glukose (0,159 osmol/kg). (c) CLSM Aufnahme eines optischen Schnitts durch eine HUP1::GFP exprimierende Zelle zeigt die Verteilung des Kanals in Clustern (Zellen vor Mikroskopie in YPD + 1 M Sorbitol (1,025 osmol/kg) aufgenommen). (d) Maximalprojektion einer HUP1::GFP exprimierenden Zell in YPD + 1 M Sorbitol (1,025 osmol/kg).

4.3.1.2.3 Vergleich der Lokalisation von KAT1 mit dem in MCC Mikrodomänen lokalisierten SUR7

SUR7, ein Membranprotein aus Hefe, dessen Funktion noch nicht eindeutig geklärt ist, gilt in Hefe als Markerprotein für PM Mikrodomänen. Es bildet einen Bestandteil der „hot spots“ für Endocytose, die eng mit PM Mikrodomänen assoziiert sind, den sogenannten Eisosomen (Walther *et al.*, 2006). Weiterhin ist es Bestandteil der als MCC bezeichneten Mikrodomänen, die einen hohen Anteil an Sterolen aufweisen (Umebayashi und Nakano, 2003). Da vermutet wird, dass auch KAT1 in Sterol assoziierten Mikrodomänen lokalisiert ist (Sutter *et al.*, 2006), ist ein Vergleich der Lokalisation von KAT1 und SUR7 interessant. Die typische Lokalisation des SUR7::GFP in der PM von *S. cerevisiae* ist in Abb. 4.27 abgebildet. Das SUR7 Protein zeigt eine punktförmige Anordnung in Clustern in der PM. Die Cluster erscheinen etwas kleiner und gleichmäßiger verteilt als bei KAT1::GFP.

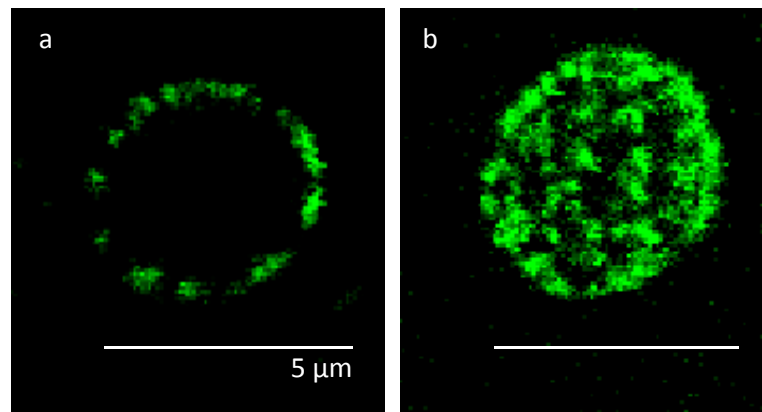


Abb. 4.27 Anordnung von SUR7::GFP in Clustern in der PM von *S. cerevisiae*. (a) CLSM Aufnahme eines optischen Schnitts durch die Hefezelle zeigt die clusterförmige Anordnung von SUR7::GFP in der PM. (b) Die Maximalprojektion von aufeinander folgenden Schnitten zeigt die räumliche Anordnung von SUR7::GFP in Clustern in der PM der gesamten Zelle.

Um zu überprüfen, ob KAT1 und SUR7 räumlich an derselben Stelle in der PM angeordnet sind, und ob sie damit eine Lokalisation in den selben Mikrodomänen zeigen, wurden KAT1::GFP und SUR7::mRFP in Hefezellen koexprimiert. Da GFP und mRFP nicht gleichzeitig angeregt werden können, wurden serielle CLSM Aufnahmen von der selben Hefezelle, einmal für SUR7::mRFP und einmal für KAT1::GFP gemacht. Abb. 4.28. zeigt ein repräsentatives Beispiel einer Hefezelle, die sowohl KAT1::GFP als auch SUR7::mRFP exprimiert. Es fällt auf, dass SUR7 in kleinen regelmäßigen Clustern in der PM vorliegt. KAT1 ist dagegen in größeren Clustern lokalisiert, die unregelmäßiger verteilt sind. Um die Lokalisation der beiden Proteine quantifizieren zu können, wurden, wie in Abb. 4.28. gezeigt, die relativen Fluoreszenzintensitäten entlang einer Linie ermittelt, die durch einen Abschnitt der PM gelegt wurde. Für die Bestimmung der Kolo-kalisation wurden zwei charakteristische Bereiche ausgewählt. Der erste Bereich entspricht einer Stelle mit mehr KAT1::GFP Lokalisation (in der Abb. 4.28 mit A gekennzeichnet). Die zweite Stelle entspricht einem Bereich, in dem kaum KAT1::GFP vorliegt (in der Abb. 4.28. mit B gekennzeichnet) Die so erhaltenen Fluoreszenzintensitäten sind in Abb. 4.29. und Abb. 4.30. graphisch dargestellt.

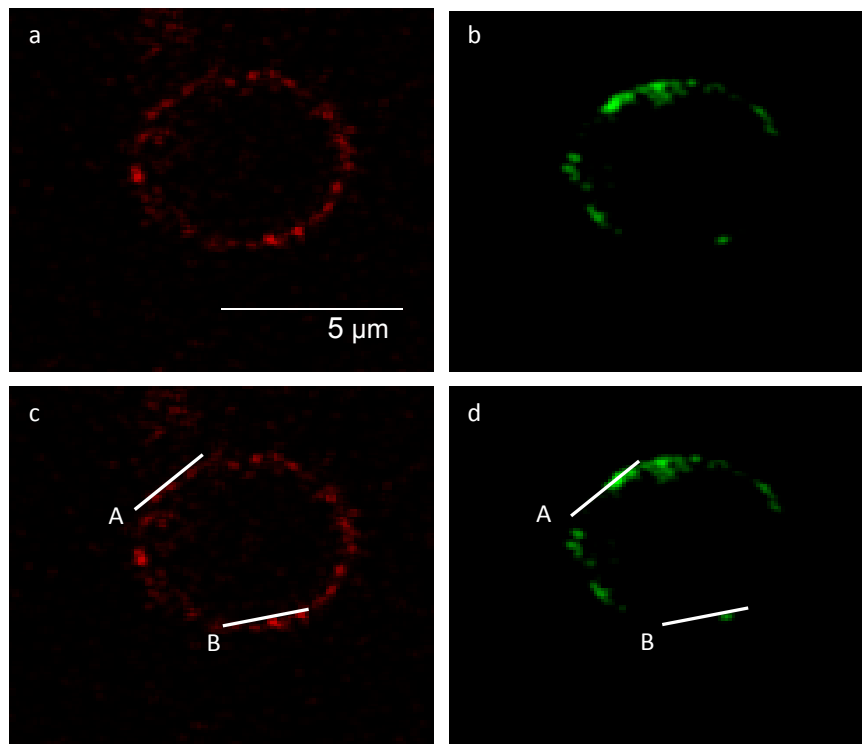


Abb. 4.28 Koexpression des in Mikrodomänen lokalisierten Proteins SUR7::mRFP und KAT1::GFP. (a) zeigt die Lokalisation des SUR7::mRFPs in einem optischen Schnitt durch die Hefezelle. In (b) ist die Lokalisation des KAT1::GFP am selben Schnitt durch die Zelle zu sehen. Die für die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten gelegten Linien durch den Bereich der PM sind in (c) und (d) dargestellt. Der Bereich mit viel KAT1::GFP Lokalisation ist mit A, der Bereich mit wenig KAT1::GFP Lokalisation ist mit B gekennzeichnet.

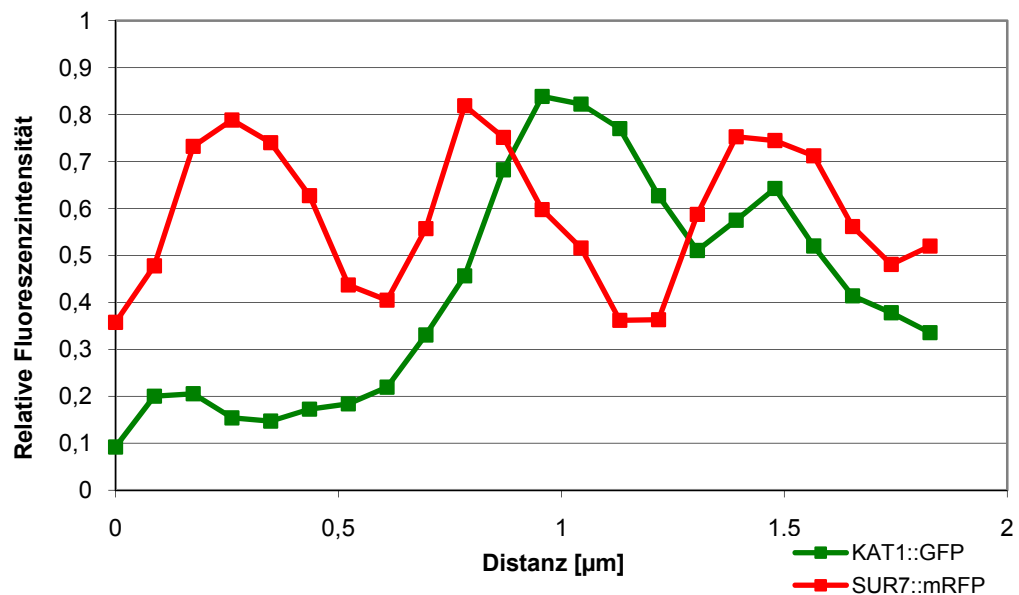


Abb. 4.29 Graphische Darstellung des Fluoreszenzintensitätsprofils für KAT1::GFP (grün) und SUR7::mRFP (rot) entlang der in Abb. 4.28. gezeigten Linie A.

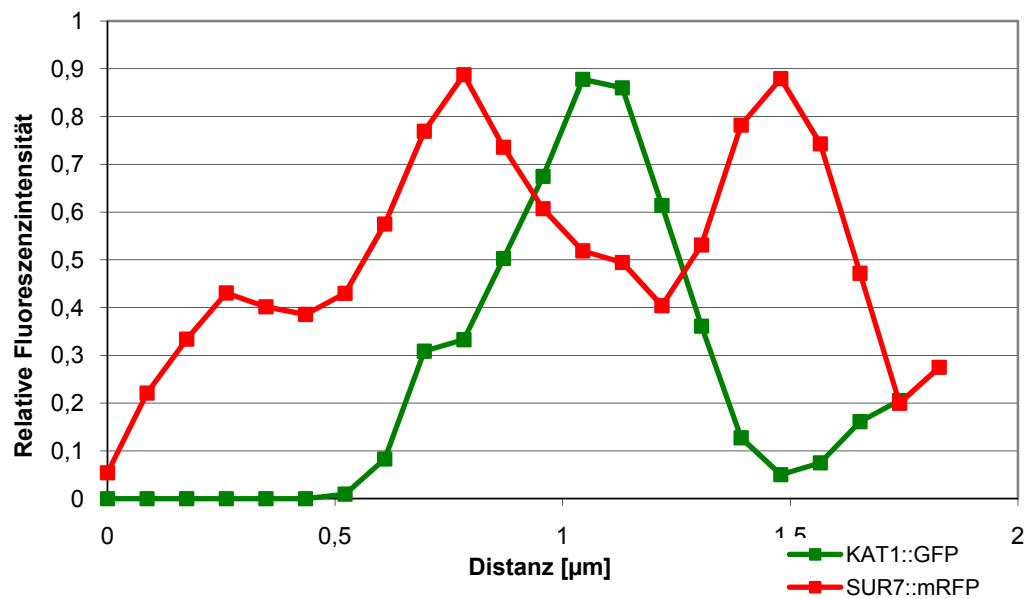


Abb. 4.30 Graphische Darstellung des Fluoreszenzintensitätsprofils für KAT1::GFP (grün) und SUR7::mRFP (rot) entlang der in Abb. 4.28. gezeigten Linie B

Bei dem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten fällt auf, dass der Verlauf der Intensitäten für SUR7 und KAT1 entlang der Linie A partial überlappt. Dennoch ist die KAT1::GFP Intensität nicht dort am stärksten, wo die SUR7::mRFP Intensität am höchsten ist. Dies zeigt, dass KAT1 nicht genau an derselben Stelle wie SUR7 lokalisiert ist. Diese Beobachtung wird durch die Fluoreszenzintensitätsverteilung entlang der Linie B bestätigt. Im Bereich B ist sogar zu beobachten, dass die Intensitäten einen gegensätzlichen Verlauf zeigen. An der Stelle zwischen zwei SUR7 Clustern, an der am wenigsten Fluoreszenzintensität des SUR7::mRFP vorliegt, ist die Intensität für das KAT1::GFP am stärksten. Eine solche Verteilung zeigt an, dass KAT1 und SUR7 gerade nicht an genau derselben Stelle und damit nicht in den selben Mikrodomänen der PM vorliegen.

4.4 Charakterisierung der Faktoren die zur Clusterbildung und Stabilisierung beitragen

Um zu analysieren, welche Faktoren und äußere Bedingungen die räumliche Anordnung des KAT1 Kanals in Patches bedingen und zur Aufrechterhaltung dieser Verteilung notwendig sind, wurden verschiedene Faktoren getestet.

4.4.1 Einfluss des Membranpotentials auf die räumliche Verteilung von KAT1 und HUP1

Untersuchungen der Lokalisation von HUP1 in Abhängigkeit vom Membranpotential führten zu der Annahme, dass seine Lokalisation in Mikrodomänen der PM durch eine Veränderung des Membranpotentials beeinflusst werden könnte (Grossmann *et al.*, 2007). Dabei berichten Grossmann *et al.* von einer Auflösung der HUP1 Cluster nach einer Depolarisation der Plasmamembran. Diese interessante Möglichkeit der Clusterstabilisierung über das Membranpotential sollte auch für den spannungsregulierten K^+ -Einwärtsgleichrichter KAT1 getestet werden.

Grossmann *et al.* (2007) hatten dabei die Membrandepolarisation mit recht drastischen Methoden, wie Entkopplung des Protonengradienten, Inhibierung der ATP Synthese und Anlegen eines externen elektrischen Feldes bewirkt. Diese Methoden können in der Zelle neben der Membrandepolarisation zu Nebenwirkungen führen. Um dies zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit eine Methode nach Gaskova *et al.*, (1999) gewählt, wobei die Depolarisation über eine erhöhte K^+ -Konzentrationen im umgebenden Medium bewirkt wird. Die durch eine Erhöhung der K^+ -Konzentrationen herbeigeführte Depolarisation kann durch spektralphotometrische Messungen mit Hilfe des spannungsabhängigen Fluoreszenzfarbstoffs Bisoxonol analysiert werden. Gelangt bei einer Depolarisation mehr Farbstoff in die Zelle, wird die Depolarisation durch eine relative Erhöhung der gemessenen Fluoreszenzintensität sichtbar gemacht (Abb. 4.31). Bei jeder Erhöhung der K^+ -Konzentration durch weiteren Zugabe von 1 M KCl-Lösung (resultierende Endkonzentration ist in Abb. 4.31. angegeben) konnte ein Anstieg der Depolarisation nachgewiesen werden.

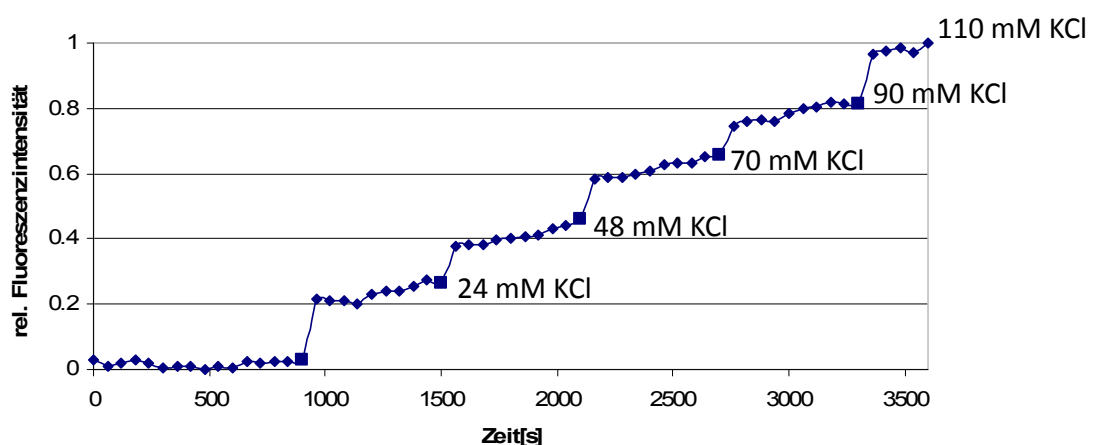


Abb. 4.31 Spektralphotometrischer Nachweis der Membrandepolarisation mit Hilfe des Bisoxonol Farbstoffs. Die Depolarisation ist verbunden mit einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Die Erhöhung der K^+ -Konzentration erfolgte an den hervorgehobenen Zeitpunkten.

Um den Einfluss des Membranpotentials auf die Verteilung des KAT1::GFP in *S. cerevisiae* in der PM zu untersuchen, wurden die KAT1::GFP exprimierenden Hefezellen in 1 M Tris Puffer (pH 7) aufgenommen und 1 M KCl-Lösung zu einer Endkonzentration von 24 mM, 48 mM, 70 mM, 90 mM, 110 mM KCl zugegeben und anschließend mikroskopiert. Die typische Verteilung des KAT1::GFP in der PM sind in Abb. 4.32. zu sehen. Bei allen getesteten K⁺-Konzentrationen, zeigt der Kanal deutlich eine Verteilung in Clustern in der PM.

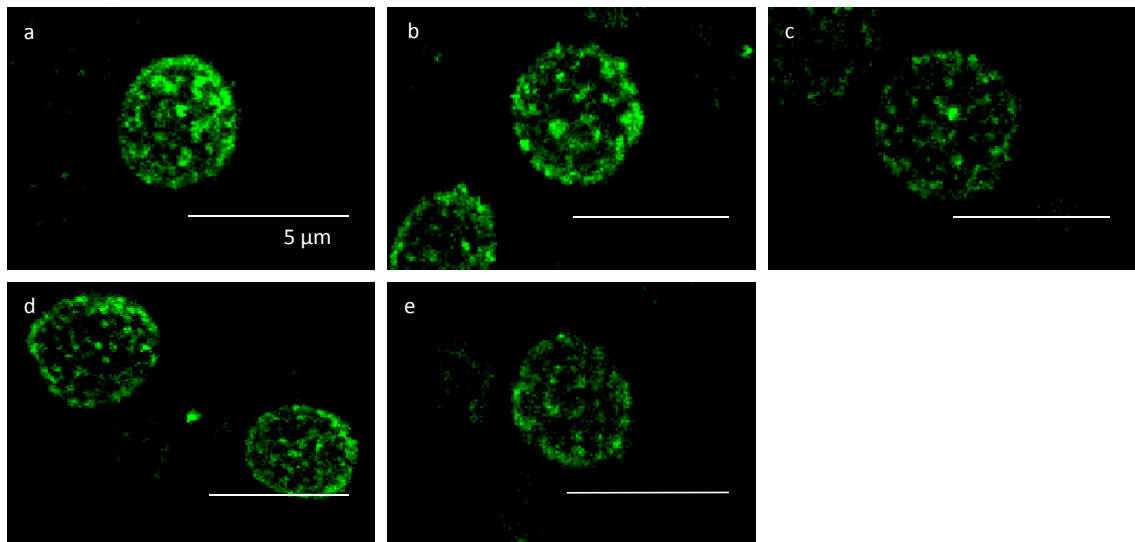


Abb. 4.32 Verteilung von KAT1::GFP in Hefezellen bei unterschiedlichen K⁺-Konzentrationen. Maximalprojektionen von KAT1::GFP exprimierenden Hefezellen in 1 M Tris pH 7 mit unterschiedlichen K⁺-Konzentration zeigen unabhängig von der KCl-Konzentration und der damit induzierten Depolarisation eine Verteilung von KAT1 in Clustern. (a) KCl-Endkonzentration von 24 mM, (b) KCl-Endkonzentration von 48 mM, (c) KCl-Endkonzentration von 70 mM, (d) KCl-Endkonzentration von 90 mM, (e) KCl-Endkonzentration von 110 mM KCl.

Bei einem qualitativen Vergleich der Aufnahmen des KAT1 in den unterschiedlichen KCl-Konzentrationen entstand der Eindruck, dass sich die Verteilung des KAT1 mit zunehmender Kaliumkonzentration, also mit zunehmender Membrandepolarisation, zu kleineren Clustern verschiebt. Um diesen Eindruck quantitativ zu erfassen, wurden die Clustergrößen ausgewertet. Hierzu wurde die Verteilung der Fluoreszenzintensität an der Oberfläche einer Zelle bestimmt (*surface plot*), wobei die Fluoreszenzintensitäten gegen die x- und y-Dimension aufgetragen wurden. Diese zweidimensionale Verteilung kann dann in einer pseudo dreidimensionalen Darstellung gegen die Intensität aufgetragen werden (Abb. 4.33). Die ermittelten relativen Intensitäten wurden anschließend mit einer elliptischen 2D-Gaußkurve gefittet, mit welcher der *full width at half maximum* (FWHM) Wert ermittelt wurde, der ein Maß für die Größe der Cluster ist.

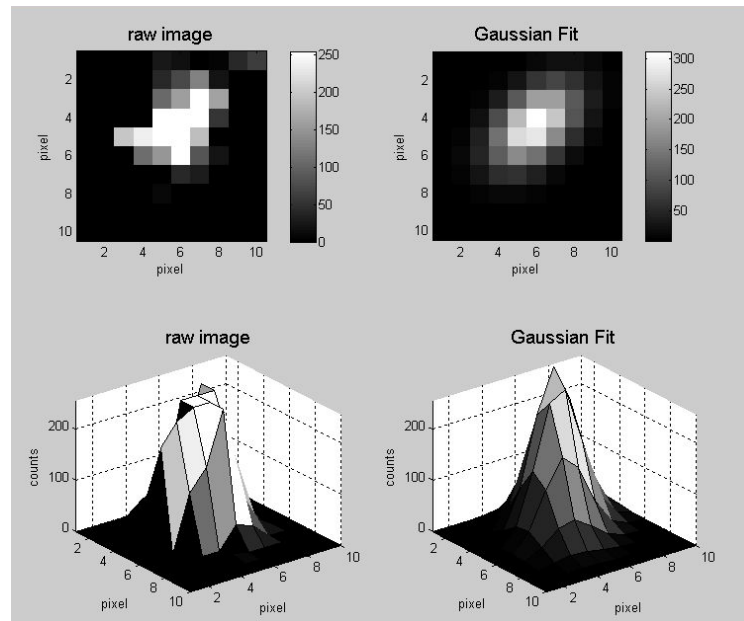


Abb. 4.33 Bestimmung der räumlichen Verteilung der Fluoreszenzintensität, die mit einer elliptischen 2D Gaußkurve gefittet wurde.

Die ermittelte Größenverteilung der Cluster ist in Abb. 4.34 graphisch dargestellt. Als Referenz wurden auch die Clustergrößen von KAT1 im Standardmedium YPD, 0,2 % Glukose (keine Membrandepolarisation) aufgetragen. Die ermittelte Clustergröße lag zwischen 150 und 500 nm, wobei Cluster mit einer Größe von 250 nm am häufigsten auftraten. Die Größenverteilung der Cluster nach der Depolarisation (24 mM und 110 mM KCl) ist der Verteilung im Standardmedium sehr ähnlich. Auch hier zeigten die Cluster am häufigsten eine Größe von 200 bis 250 nm. In allen Fällen lag auch der Median der Clustergröße bei 250 nm. Auffällig ist allerdings die größere Anzahl an Clustern mit einem Durchmesser von ≤ 150 nm in erhöhten K^+ -Konzentrationen. Hierdurch könnte der Eindruck entstehen, dass bei höheren K^+ -Konzentrationen vermehrt kleinere Cluster vorliegen.

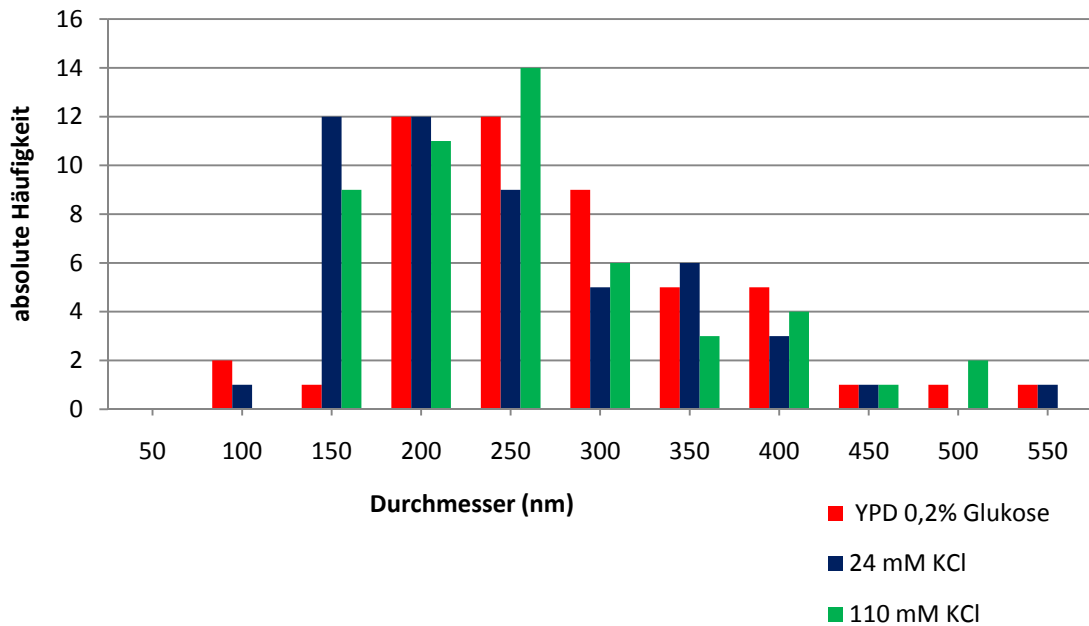


Abb. 4.34 Verteilung der KAT1 Clustergrößen in Abhängigkeit von der K^+ -Konzentration. Aufgetragen wurden die Clustergrößen bei erhöhter K^+ -Konzentration (24 und 110 mM KCl) und damit einhergehender Membrandepolarisation, im Vergleich zu den Clustergrößen in Standard YPD-Medium. $n = 50$.

Die sehr ähnliche Größenverteilung der Cluster bei unterschiedlichen K^+ -Konzentrationen zeigt, dass die Membrandepolarisation keinen Einfluss auf die Clustergröße und damit die Verteilung von KAT1 hat.

Für den Hexosetransporter HUP1 ergab sich bereits in 50 mM Tris-Puffer (pH 7) vor der Zugabe der KCl-Lösung eine homogene Verteilung in der PM (Abb. 4.35.), die sich auch mit Zugabe der unterschiedlichen KCl-Lösungen nicht änderte. Dadurch war kein Nachweis des homogenisierenden Effekts der Membrandepolarisation möglich.

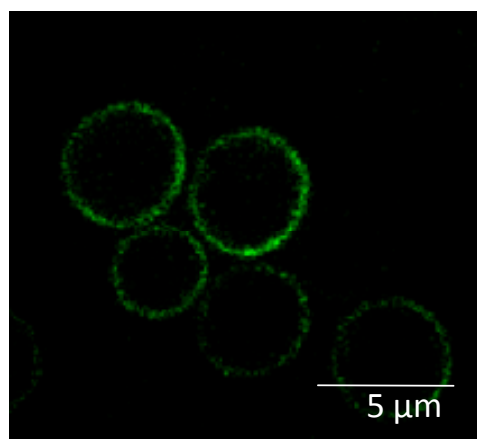


Abb. 4.35 Homogene Verteilung des HUP1::GFP unabhängig von der K^+ -Konzentration bereits vor der Zugabe der KCl-Lösung in 50 mM Tris pH 7. Optischer Schnitt durch eine HUP1::GFP exprimierende Hefezelle.

Werden die HUP1::GFP exprimierenden Hefen vor der Membrandepolarisation in 1 M Tris-Puffer (pH 7) aufgenommen, zeigen sie eine Verteilung in Clustern, die jedoch auch nach Erhöhung der K⁺-Konzentration und der damit verbundenen Membrandepolarisation bestehen blieb (Abb. 4.36).

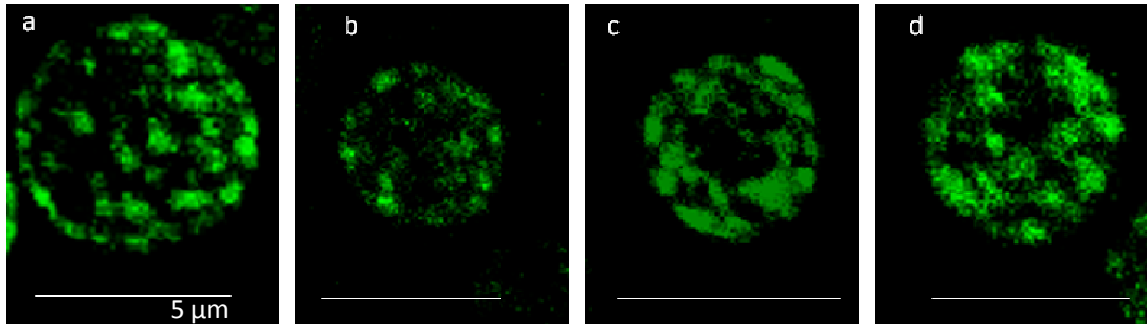


Abb. 4.36 Lokalisation des HUP1 in Clustern in 1 M Tris-Puffer (pH 7) auch nach der Membrandepolarisation durch Zugabe von KCl-Lösung ins umgebende Medium. (a) Maximalprojektion einer HUP1::GFP exprimierenden Hefezelle vor der Depolarisation. (b) Maximalprojektion bei 100 mM KCl im Medium. (c) Maximalprojektion bei 200 mM KCl im Medium. (d) Maximalprojektion bei 300 mM KCl im Medium.

4.4.2 Einfluss der Osmolarität auf die Verteilung von Membranproteinen

Um den Einfluss der Veränderung der Osmolarität des Außenmediums auf die Lokalisation von KAT1::GFP und anderen Membranproteinen zu testen, wurden die Lokalisation dieser Proteine in Lösungen unterschiedlicher Osmolaritäten am CLSM untersucht.

Hierzu wurden zunächst KAT1::GFP exprimierende Hefezellen in Medium mit einer Osmolarität von 0,16 osmol/kg bis 2,2 osmol/kg gegeben und direkt, oder nach 24 Stunden mikroskopiert. Die Verteilung des KAT1::GFP zeigte, unabhängig von der Osmolarität des Mediums, immer Clusterstrukturen (Abb. 4.37). Die KAT1 Cluster waren zeitlich stabil und lösten sich auch nach längerer Inkubation (24 h) in Medium mit höherer Osmolarität nicht auf.

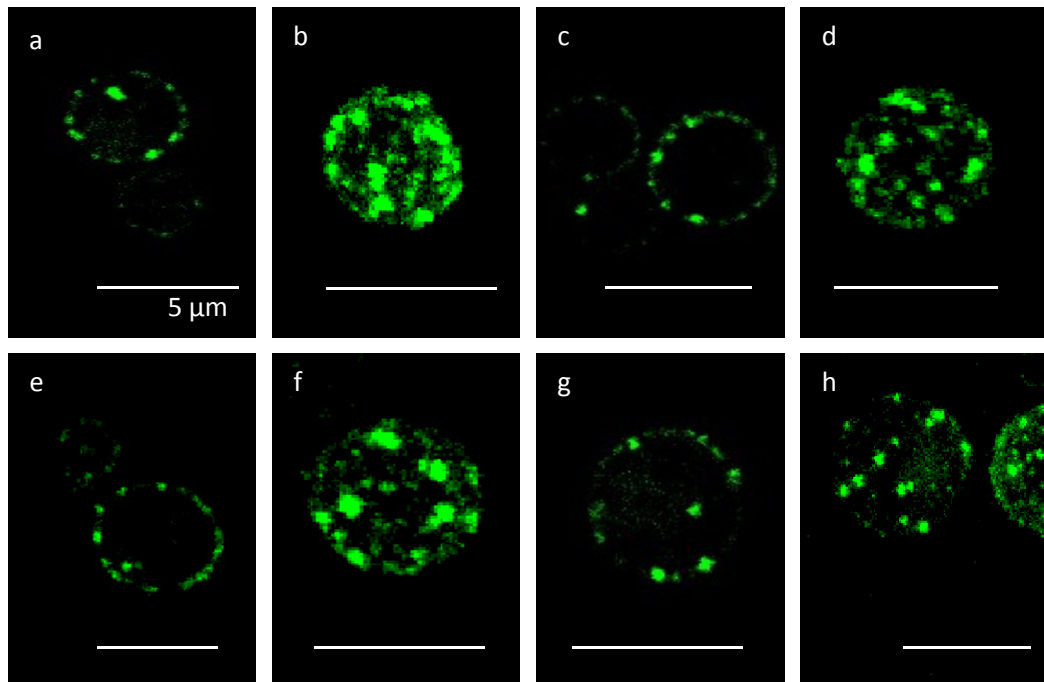


Abb. 4.37 Räumliche Anordnung des KAT1 in Clustern ist unabhängig von der Osmolarität. (a) und (b) optischer Schnitt bzw. Maximalprojektion durch eine KAT1::GFP exprimierende Hefezelle in 0,16 osmol/kg. (c) und (d) optischer Schnitt bzw. Maximalprojektion bei 1 osmol/kg. (e) und (f) optischer Schnitt bzw. Maximalprojektion in 1,6 osmol/kg. (g) und (h) optischer Schnitt bzw. Maximalprojektion bei 2,2 osmol/kg.

Auch ein Vergleich der Clustergrößen zwischen den KAT1::GFP exprimierenden Hefezellen in Medium mit sehr niedriger (0,16 osmol/kg) und mit der höchsten untersuchten Osmolarität (2,2 osmol/kg) ergaben kaum Unterschiede (Abb. 4.38.). Dies bestätigt nochmals, dass die Lokalisation von KAT1::GFP nicht durch die Osmolarität beeinflusst wird.

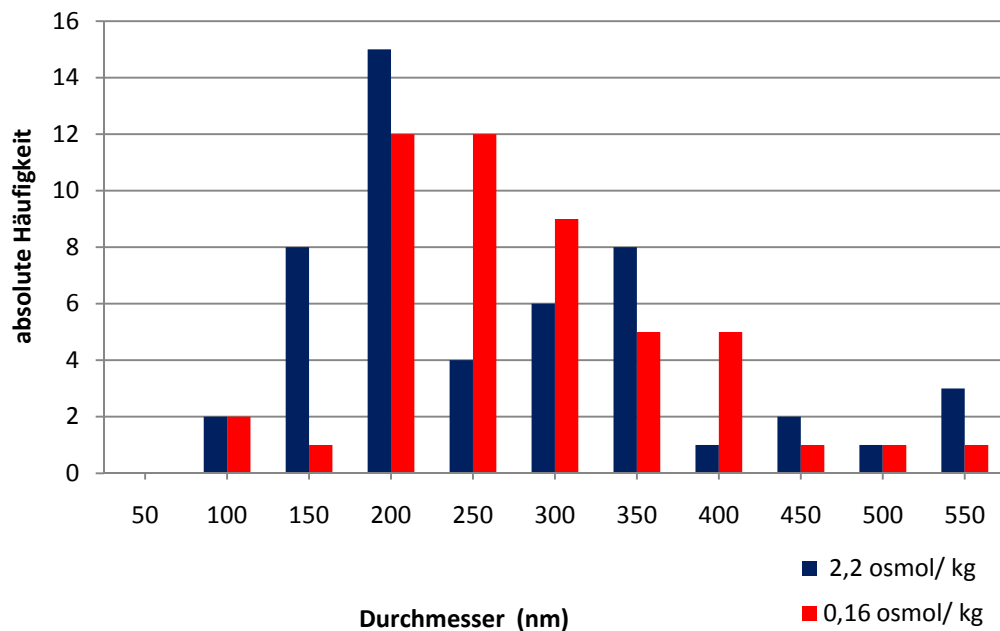


Abb. 4.38 Absolute Größenverteilung der KAT1-Cluster. Vergleich der Cluster bei niedriger Osmolarität (0,16 osmol/kg) mit hoher Osmolarität (2,2 osmol/kg), n = 50.

Im Gegensatz zu KAT1 ist der Tandem K⁺-Kanal TOK1 aus *S. cerevisiae* homogen in der PM verteilt. Diese Verteilung wurde ebenfalls nicht durch einen Wechsel der Osmolarität im Medium beeinflusst (Abb. 4.39.).

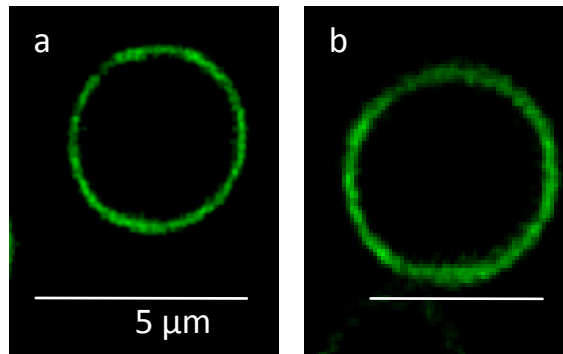


Abb. 4.39 Die homogene Verteilung des TOK1::GFP ist unabhängig von der Osmolarität. (a) Optischer Schnitt durch eine TOK1::GFP exprimierende Hefezelle in ddH₂O (0 osmol/kg). (b) Maximalprojektion einer TOK1::GFP exprimierenden Hefezelle in 1 M Sorbitol (1,5 osmol/kg).

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen räumlicher Anordnung und Osmolarität des Außenmediums zeigte sich bei dem Hexosetransporter HUP1 ein deutlicher Einfluss der Osmolarität auf seine Lokalisation in der PM. Wurde die Verteilung des Proteins in einem Medium mit geringer Osmolarität (0 osmol/kg bis etwa 1 osmol/kg) untersucht, zeigte der Symporter eine sehr homogene Verteilung in der PM. Direkt nach der Überführung in Lösungen mit einer höheren Osmolarität (ab 1 osmol/kg) kam es zu einer fleckigen Anordnung in Clustern (Abb. 4.40).

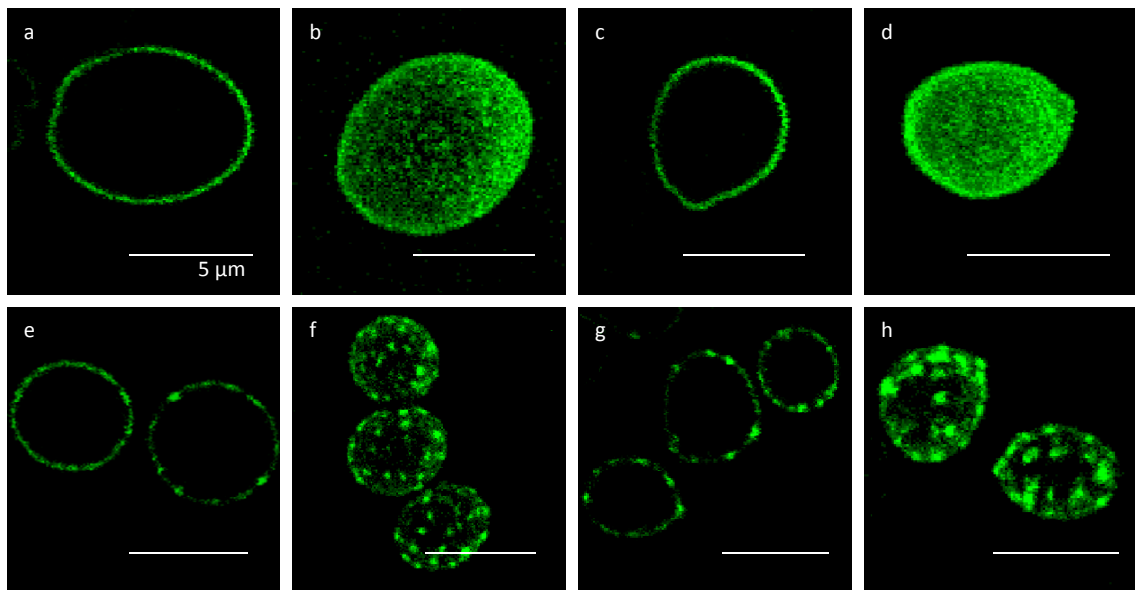


Abb. 4.40 Homogene Verteilung des HUP1::GFP bei niedrigen Osmolaritäten und Anordnung in Clustern bei höheren Osmolaritäten ab 1 osmol/Kg. (a) und (b) Optischer Schnitt bzw. Maximalprojektion durch eine HUP1::GFP exprimierende Hefezelle in Medium mit 0,15 osmol/kg. (c) und (d) Optischer Schnitt bzw. Maximalprojektion bei 0,16 osmol/kg. (e) und (f) Optischer Schnitt bzw. Maximalprojektion bei 1 osmol/kg zeigt den Übergang von homogener Verteilung zu Clustern. g und h Optischer Schnitt bzw. Maximalprojektion bei 2,2 osmol/kg.

Die HUP1::GFP Anordnung in Clustern aufgrund der Osmolarität war zeitlich begrenzt. Schon ab ca. 5 bis 10 min nach dem osmotischen Schock ließ die Anordnung in Clustern nach. Zellen, die über einen längeren Zeitraum in Medium mit hoher Osmolarität inkubiert wurden, zeigten eine komplette Wiederherstellung der homogenen HUP1 Verteilung (Abb. 4.41).

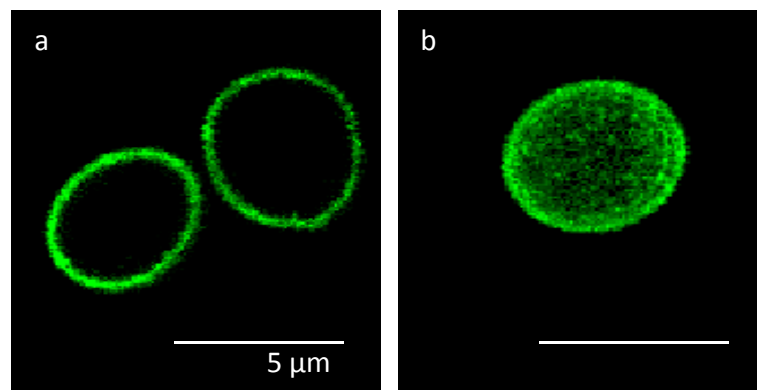


Abb. 4.41 Homogene Verteilung des HUP1::GFP trotz hoher Osmolarität (1,6 osmol/kg) nach längerer Inkubation (24 h). Optischer Schnitt (a) und Maximalprojektion (b) einer HUP1::GFP exprimierenden Hefezelle.

Ebenso wie HUP1 zeigte auch der spannungsabhängige, auswärtsgerichtete K^+ -Kanal rEAG1 (Kv10.1) eine homogene Verteilung in Medium mit niedriger Osmolarität. Bei rEAG1 kam es auch, wie bei HUP1, direkt nach der Überführung in Medium mit hoher Osmolarität zu einer Anordnung des Kanals in Clustern (Abb. 4.42).

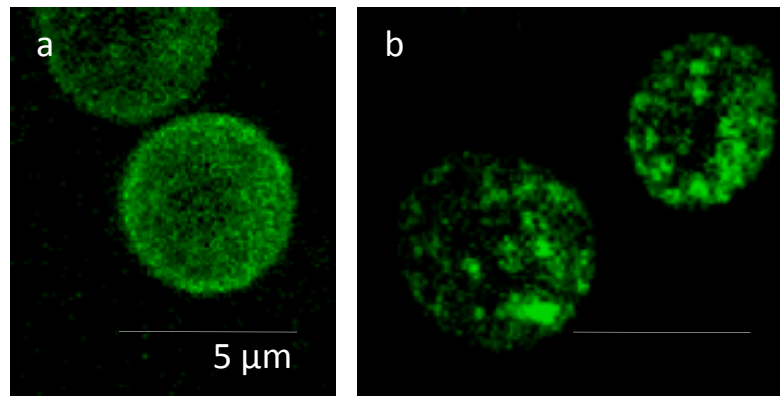


Abb. 4.42 Homogene Verteilung des rEAG1::GFP bei niedrigen Osmolaritäten und Anordnung in Clustern bei höheren Osmolaritäten. (a) Maximalprojektion einer rEAG1::GFP Hefezelle in ddH₂O (0 osmol/kg). (b) Maximalprojektion einer rEAG1::GFP Hefezelle in 1 M Sorbitol (1,5 osmol/kg)

Die Untersuchungen bei unterschiedlichen Osmolaritäten zeigten keinen einheitlichen Einfluss auf die Lokalisation von Membranproteinen. Sowohl die Cluster von KAT1 als auch die homogene Verteilung von TOK1 waren von der Osmolarität unabhängig. Dagegen zeigte sich bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen räumlicher Anordnung und Osmolarität bei dem Hexosetransporter HUP1 und dem K⁺-Kanal rEAG1 ein deutlicher Einfluss der Osmolarität. HUP1 und rEAG1 veränderten ihre Verteilung von homogener Anordnung bei niedriger Osmolarität zu einer punktförmigen Verteilung bei höherer Osmolarität (ab 1 osmol/kg).

4.4.3 Einfluss von Sterolen auf die räumliche Verteilung von KAT1

Für den K⁺-Kanal KAT1 wird aufgrund der Anordnung in Clustern, der Aufreinigung in einer *moderate detergent resistant membrane fraction* (Sutter *et al.*, 2006), so wie durch die in Abschnitt 4.1 gezeigte Unbeweglichkeit in der PM, eine Lokalisation in sterolhaltigen Mikrodomänen angenommen. Daher war es naheliegend, den Einfluss von Sterolen auf die Lokalisation von KAT1 auch im Modellsystem *S. cerevisiae* zu untersuchen. Ein großer Vorteil am *S. cerevisiae* Modellsystem ist die große Anzahl an bereits vorhandenen Deletionsmutanten. Für die Untersuchung der Sterolabhängigkeit der Lokalisation des KAT1 wurde der Hefestamm BY4741Δerg6 verwendet, bei dem die Ergosterolsynthese auf der Stufe der Delta-(24)-Sterol-C-methyltransferase blockiert ist und diese Zellen aufgrund der veränderten Membranzusammensetzung keine klassische Untergliederung der Membran in sterolhaltige Mikrodomänen aufweisen.

Auch im Δerg6 Hefestamm zeigte KAT1 eine Anordnung in Clustern innerhalb der PM. (Abb. 4.43) Die Verteilung der Cluster über die PM erscheint in der Δerg6 Mutante jedoch gleichmäßiger über die PM verteilt als im BY4741 Wildtyp. Weiterhin wirken die KAT1 Cluster in der Δerg6 Mutante kleiner und punktförmiger.

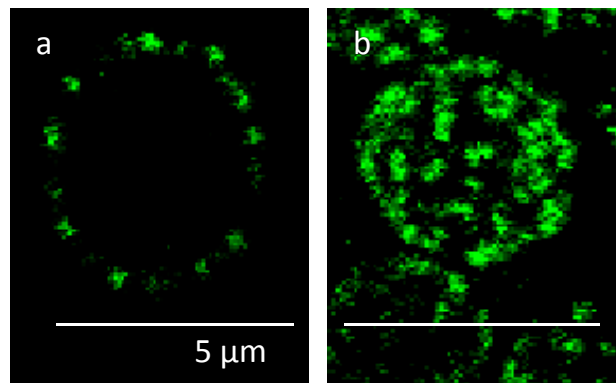


Abb. 4.43 Verteilung des KAT1::GFP in kleinen Clustern innerhalb der PM in der Ergosterolmutante Δerg . (a) Optischer Schnitt durch eine KAT1::GFP exprimierende BY4741 Δerg6 Hefezelle. (b) Maximalprojektion einer KAT1::GFP exprimierende BY4741 Δerg6 Hefezelle.

Um die Clustergrößen in der BY4741 Δerg6 Mutante quantitativ zu analysieren, wurde auch hier die Größenverteilung der Cluster bestimmt (Abb. 4.44). Die meisten Cluster in der BY4741 Δerg6 Mutante hatten eine Größe zwischen 200 und 250 nm, wie es auch für KAT1 Cluster im Wildtyp gezeigt wurde. Auffallend war aber, dass in der BY4741 Δerg6 Mutante keine Cluster mit einem Durchmesser über 350 nm ermittelt werden konnten. Im Wildtyp wurden auch Cluster mit einem Durchmesser über 350 nm, bis hin zu 550 nm beobachtet. Es scheint also so, dass die Bildung von größeren Clustern in der BY4741 Δerg6 Mutante nicht vorkommt. Dieser Eindruck wird auch nochmals bestätigt, wenn die Cluster in zwei Populationen, die kleinen Cluster bis 250 nm und großen Cluster ab 250 nm, geteilt werden. (Abb. 4.45) Dabei liegt das Verhältnis von kleinen zu großen Clustern im Wildtyp bei etwa 50 % kleinen Clustern zu 50 % großen Clustern und in der BY4741 Δerg6 Mutante bei etwa 80 % kleinen Clustern zu 20 % großen Clustern. Bei einer Bewertung des Unterschieds zwischen der Anzahl der großen Cluster des Wildtyps und der BY4741 Δerg6 Mutante ergab der t-Test mit 0,01 bei einem Signifikanzniveau von 5 % einen signifikanten Unterschied.

Abschließend kann daher gefolgert werden, dass die geänderte Sterolzusammensetzung der Membran zwar keine Homogenisierung der KAT1 Lokalisation bewirkt, sich aber dennoch ein signifikanter Unterschied in der Größenverteilung der Cluster ergibt. Die Lokalisation in Clustern scheint daher in geringem Maße von der Sterolzusammensetzung der PM beeinflusst zu werden. Die Clusterbildung kann aber auch ohne intakte Subkompartimentierung der PM in sterolhaltige Mikrodomänen erfolgen. Die Sterole können damit nicht als alleiniger Faktor die Lokalisation des KAT1 beeinflussen.

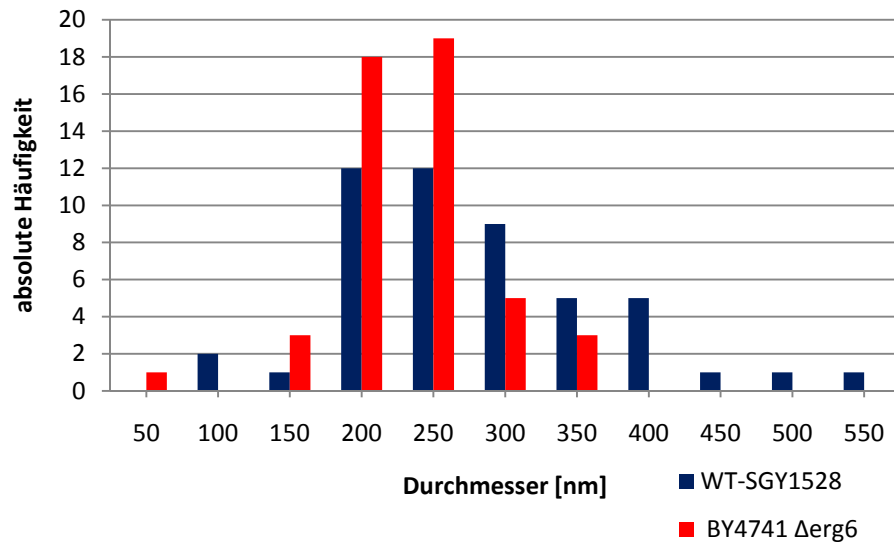


Abb. 4.44 Absolute Größenverteilung der Cluster. Vergleich der Cluster des Wildtyp Hefestamms SGY1528 mit der Sterol Mutante BY4741 Δ erg6, n = 50.

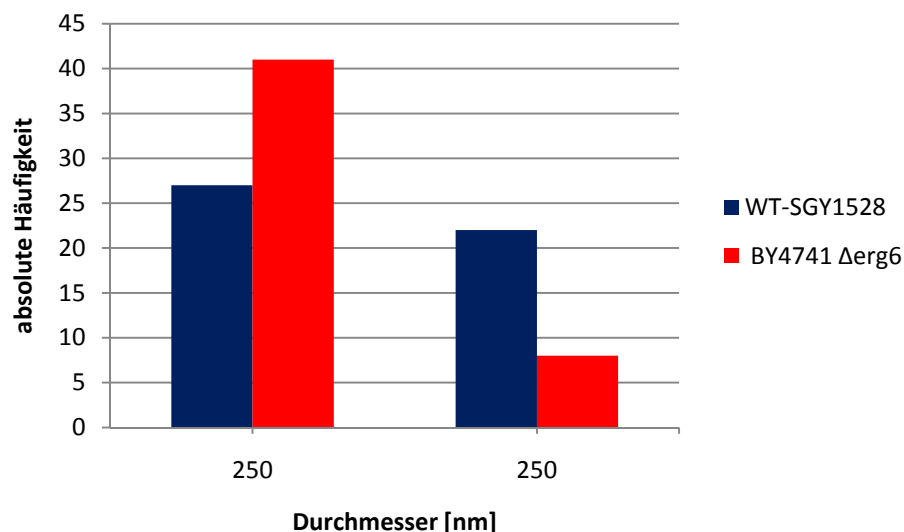


Abb. 4.45 Aufteilung der Clustergrößen in die Population der kleinen Cluster bis 250 nm und der großen Cluster ab 250 nm. In der BY4741 Δ erg6 Mutante treten deutlich weniger große Cluster auf.

4.4.4 Einfluss der Zellwand auf die räumliche Verteilung von KAT1

Die Protein-Zellwand-Interaktion stellt ebenfalls einen weiteren potentiellen Faktor dar, der die Lokalisation von Membranproteinen beeinflussen könnte. Vom Markerprotein der MCC Mikrodomänen SUR7 ist bekannt, dass die Zellwand die Anordnung des Proteins beeinflusst. Die Verteilung von SUR7 ändert sich von clusterförmig, bei intakter Zellwand, zu einer homogenen Verteilung nach dem Verdau der Zellwand (Young *et al.*, 2002).

Auch in der vorliegenden Arbeit ergab einer Untersuchung der Verteilung des SUR7 nach der Protoplastierung, wie erwartet, eine homogene Verteilung des Proteins in der PM der zellwandlosen Protoplasten im Vergleich zu einer Lokalisation in Clustern in intakten

Hefezellen. (Abb. 4.46) Als Nachweis der vollständigen Entfernung der Zellwand wurde überprüft, ob die untersuchten Protoplasten durch Zugabe von ddH₂O aufgrund des Wassereinstroms bei hypoosmotischen Bedingungen zum Platzen gebracht werden können.

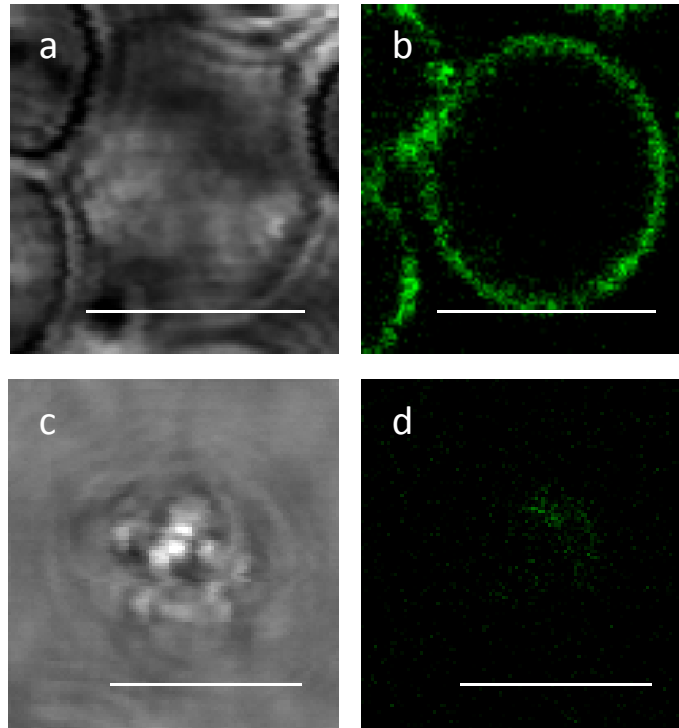


Abb. 4.46 Lokalisationsänderung von SUR7::GFP zu einer homogenen Verteilung in Protoplasten. (a) DIC Aufnahme des untersuchten Protoplasten. (b) Fluoreszenz-Aufnahme des in (a) gezeigten, SUR7::GFP exprimierenden Protoplasten. (c) DIC Aufnahme des Protoplast nach Platzen durch Zugabe von ddH₂O. (d) Fluoreszenz-Aufnahme der in c gezeigten Zelle. Skalierungsbalken 5 μ m.

Auch für KAT1 gibt es Hinweise auf eine Kanal-Zellwand-Interaktion. KAT1 zeigt bei Expression in *Vicia faba* Schließzellen eine Anordnung in radiären Streifen. Plasmolyse führt zum Verlust der Streifigkeit, wenn der enge Kontakt zur Zellwand unterbrochen ist (Homann *et al.*, 2007). Dies deutet auf eine direkte oder indirekte Interaktion des Kanals mit der Zellwand hin. Um die Auswirkung der Zellwand auf die Lokalisation von KAT1::GFP in Hefe zu untersuchen, wurde auch von KAT1::GFP exprimierenden Hefezellen die Zellwand verdaut. Nach der Entfernung der Zellwand zeigte KAT1 nach wie vor eine Anordnung in Clustern in der PM (Abb. 4.47). Auch hier wurde der vollständige Verdau durch Platzen der Protoplasten unter hypoosmotischen Bedingungen getestet.

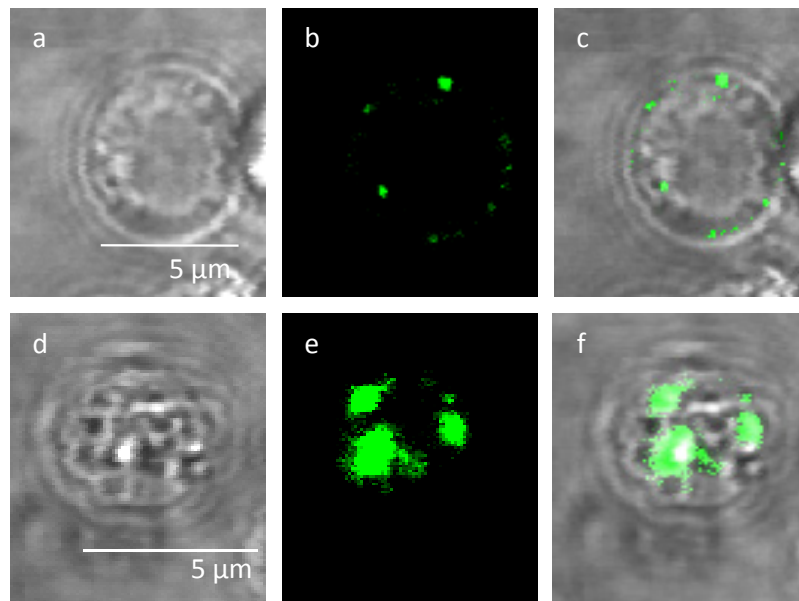


Abb. 4.47 Lokalisation des KAT1::GFP in Clustern nach Protoplastierung. (a) DIC Aufnahme des untersuchten Protoplasten. (b) Fluoreszenz-Aufnahme des in (b) gezeigten, KAT1::GFP exprimierenden Protoplasten. (c) Überlagerung des DIC und des Fluoreszenzbildes. (d) DIC Aufnahme des Protoplast nach Platzen durch Zugabe von ddH₂O. (e) Fluoreszenz-Aufnahme der in (d) gezeigten Zelle. (f) Überlagerung des DIC und des Fluoreszenzbildes

Wurden jedoch die beiden potentiellen Stabilisierungsfaktoren der KAT1 Cluster, Zellwand und Sterole gleichzeitig entfernt, zeigte sich eine homogene Verteilung des KAT1 in der PM von Protoplasten der Δ erg6 Mutante (Abb. 4.48). Die homogene Verteilung des KAT1 war dabei mehr oder weniger stark ausgeprägt, zeigte aber einen klaren Unterschied zu den Wildtyp Hefeprotoplasten.

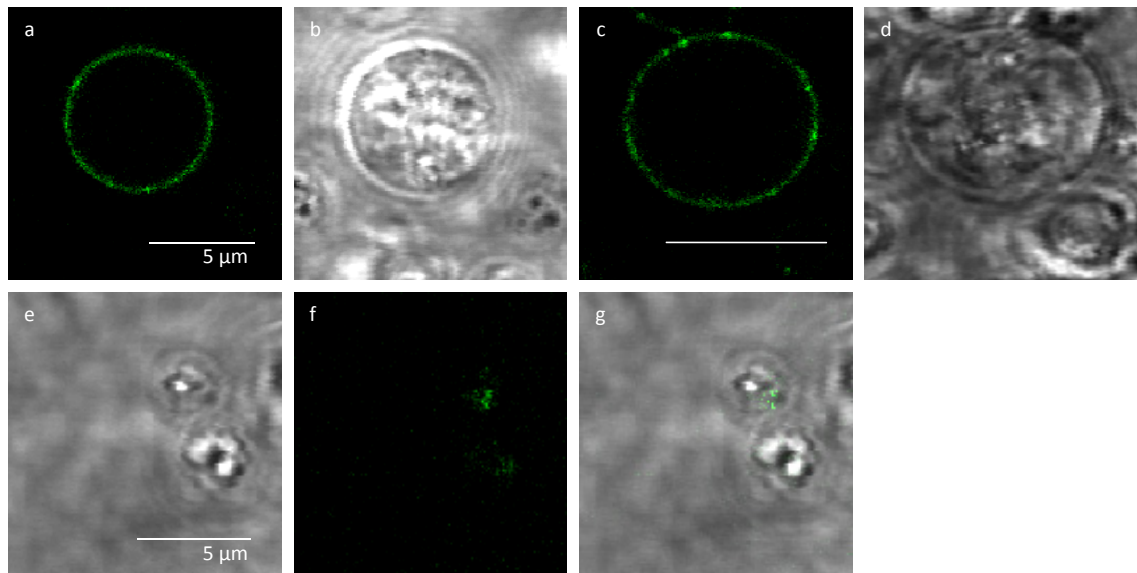


Abb. 4.48 Homogene Lokalisation des KAT1::GFP in Protoplasten der Δ erg6 Mutante. (a) Fluoreszenzbild einer stark ausgeprägten homogenen Verteilung des KAT1::GFP in Protoplasten der Δ erg6 Mutante. (b) DIC Aufnahme der unter (a) gezeigten Zelle. (c) Fluoreszenzbild einer weniger stark ausgeprägten homogenen Verteilung des KAT1::GFP in Protoplasten der Δ erg6 Mutante. (d) DIC Aufnahme der unter (c) gezeigten Zelle. (e) DIC Aufnahme geplatzter Protoplasten nach Zugabe von ddH₂O. (f) Fluoreszenzbild des geplatzten Protoplasten. (g) Überlagerung der Abb. (e) und (f).

Damit wird deutlich, dass zumindest in Hefe, die Lokalisation von KAT1 in Clustern sowohl von der Interaktion mit Sterolen, Sterol angereicherten Mikrodomänen der Membran, als auch von der direkten oder indirekten Interaktion mit der Zellwand abhängig ist.

4.4.5 Zusammenfassung der Lokalisationsstudien von KAT1 und anderen Membranproteinen in *S. cerevisiae*

Tabelle 4.2 Lokalisation von KAT1 in der PM im Vergleich zu anderen Membranproteinen

Protein	Expressionssystem	Anordnung in Clustern	Homogene Verteilung	Bemerkung
KAT1, spannungsabhängiger K ⁺ -Einwärtsgleichrichter aus <i>Arabidopsis thaliana</i> ,	<i>Vicia faba</i> Schließzellen	+		Anordnung in radiären Streifen in der PM, die sich aus Clustern zusammensetzen (Homann <i>et al.</i> , 2007).
KAT1	<i>Vicia faba</i> Schließzell-Protoplasten	+		Ohne Zellwand, keine Interaktion mit der extrazellulären Matrix möglich
KAT1	<i>Vicia faba</i> Epidermiszelle	+		
KAT1	<i>Nicotiana tabacum</i> Epidermiszelle	+		Sutter <i>et al.</i> , 2006
KAT1	<i>Nicotiana tabacum</i> Epidermiszell-Protoplasten	+		Sutter <i>et al.</i> , 2006
KAT1	HEK293 Zellen	+		tierische Zelle, ohne Zellwand
KAT1	CHO-K1	+		tierische Zelle, ohne Zellwand
KAT1	MBCD behandelte HEK293 Zellen	+ -	+ -	Verarmung der PM an Sterolen inhibiert Mikrodomänen
KAT1	<i>S. cerevisiae</i>	+		
HCN4, tierischer, spannungsabhängiger K ⁺ -Kanal vom <i>shaker</i> -Typ	HEK293 Zellen	+		Kanal wurde in Mikrodomänen, DRMs nachgewiesen (Barbuti <i>et al.</i> , 2004)
TOK1, Tandem K ⁺ -Kanal aus <i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>		+	
rEAG1, spannungsaktivierbarer, auswärtsgerichteter K ⁺ -Kanal aus der Ratte	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	
HUP1, Hexose Symporter aus <i>Chlorella kessleri</i>	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	
SUR7, Protein unbekannter Funktion	<i>S. cerevisiae</i>	+		Marker für MCC Mikrodomänen in Hefe, zeigt keine Kolokalisation mit KAT1

Tabelle 4.3 Einflüsse unterschiedlicher Faktoren auf die Lokalisation von KAT1 und anderer Membranproteinen

Protein	untersuchter Faktor	Anordnung in Clustern	Homogene Verteilung
KAT1, spannungsabhängiger K ⁺ -Einwärtsgleichrichter	Membranpotential	+	
KAT1	niedrige Osmolarität	+	
KAT1	hohe Osmolarität	+	
KAT1	Zellwandverdau	+	
KAT1	Keine sterolhaltigen Mikrodomänen in der PM	+-	
KAT1	Keine sterolhaltigen Mikrodomänen in der PM und Zellwandverdau		+
rEAG1 (Kv10.1), spannungsabhängigen, auswärtsgerichtende K ⁺ -Kanal	niedrige Osmolarität		+
rEAG1 (Kv10.1)	hohe Osmolarität	+	
TOK1, Tandem K ⁺ -Kanal	niedrige Osmolarität		+
TOK1	hohe Osmolarität		+
HUP1, Hexose Symporter	Membranpotential	+	+
HUP1,	niedrige Osmolarität		+
HUP1,	hohe Osmolarität	+	
SUR7, Membranprotein in MCC Domänen lokalisiert	Zellwandverdau		+

5 Diskussion

5.1 Untersuchungen der lateralen Mobilität mit Hilfe der FRAP Technik

Mit Hilfe der FRAP Technik wurde die laterale Beweglichkeit von KAT1 in der PM bestimmt. Durch den Vergleich von pflanzlichen, tierischen Expressionssystemen, *lipid raft* assoziierten Proteinen, Sterol verarmten und mit Cytoskelett Inhibitoren behandelten Zellen, wurden Faktoren untersucht, die an der Begrenzung der lateralen Beweglichkeit und an der räumlichen Positionierung von KAT1 beteiligt sein könnten.

5.1.1 Technische Limitierung der FRAP Messungen

Bei einer generellen Betrachtung der in dieser Arbeit durchgeführten FRAP Experimente fällt auf, dass die ermittelten Werte der Fluoreszenzrückkehr sehr stark schwanken. Neben der Tatsache, dass es sich hier um Einzelzellmessungen handelt, bei denen es durch Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen zu Schwankungen kommen kann, ist die Streuung der Werte der FRAP Messung wahrscheinlich auch auf die technischen Gegebenheiten des Leica SP Mikroskops zurückzuführen. Da es bei diesem älteren Mikroskop Typ noch keinen FRAP-Assistenten (*FRAP wizard*) gibt, bei dem die Parameter wie Bleichintensität, konstante Bleichregionen und verschiedene Zeitschritte für das komplette FRAP Experiment vorbestimmt werden können, mussten diese Schritte in den Zeitserien einzeln festgelegt werden. Außerdem konnte das Bleichen nur über die *zoom in*-Funktion ausgeführt werden. Dies hatte zur Folge, dass die Bleichregion relativ groß ausfiel und nicht bei jeder Zelle exakt gleich groß war. Ein zu großer und ungenau definierter FRAP Bereich ist aus zwei Gründen problematisch. Zum einen kann die Zelle bei einem zu großen Bleichbereich durch sekundäre Effekte, wie Bildung freier Radikale, großflächig geschädigt werden. Zum anderen ist es für die Berechnung des Diffusionskoeffizienten entscheidend, die exakte Größe des gebleichten Bereiches zu bestimmen, was am Leica SP Mikroskop über die *zoom in*-Funktion nicht möglich ist.

Für FRAP Messungen an der PM konnten diese Probleme des Leica SP Mikroskops vermindert werden, indem der größte Teil des über die *zoom in*-Funktion erzeugten Bleichbereiches außerhalb der untersuchten Zelle lag. So wurden die schädlichen Sekundäreffekte auf die Zelle minimiert und die Größe der Bleichregion konnte relativ konstant gehalten werden. Die gebleichten Regionen an der Plasmamembran hatten alle eine Größe von etwa 20 μm^2 . Damit entspricht die Größe der am Leica SP Mikroskop gelegten Bleichbereiche einer Größe, in der Diffusion von Proteinen über FRAP Messungen messbar ist. In FRAP Experimenten mit großen Bleichbereichen konnten Kenworthy *et al.*

(2004) zeigen, dass *raft* und nicht *raft* Proteine in großen Bleichbereichen von 4 μm Seitenlänge, im Vergleich zu kleinen Bleichregionen, die gleichen Diffusionseigenschaften haben. Es ist daher davon auszugehen, dass der in dieser Studie verwendete Bleichbereich an der PM von etwa 20 μm^2 für FRAP Experimente geeignet ist.

Für FRAP Untersuchungen innerhalb der Zelle (zum Beispiel am ER) gibt es für das Leica SP Mikroskop jedoch keine geeignete Lösung den Bleichbereich über die *zoom in*-Funktion auf einen exakten, möglichst kleinen Bereich zu beschränken.

5.1.2 Laterale Mobilität von KAT1 in der PM von *Vicia faba* Schließzellen

Die Ergebnisse der FRAP Untersuchung an KAT1::GFP exprimierenden *Vicia faba* Schließzellen zeigen, dass KAT1 relativ unbeweglich ist. Die durchschnittlich ermittelte mobile Fraktion für KAT1::GFP lag bei 15 %. Der Werte für $t_{1/2}$ lag durchschnittlich bei 92 s. Im Vergleich zur lateralen Beweglichkeit anderer Membranlipide und Proteine scheint die Beweglichkeit von KAT1 extrem gering. So wurden von Lenne *et al.* (2006) die laterale Mobilität von verschiedenen, unter anderem auch in Mikrodomänen lokalisierten Membrankomponenten, wie Glycerophospholipide und Sphingolipide, sowie von GPI verankerte Proteine und Transmembranproteine über FRAP Messungen bestimmt. Dabei wurde für die Glycerophospholipide, Phosphatidylcholin und Phosphoethanolamin eine mobile Fraktion von fast 100 % ermittelt. Die untersuchten Sphingolipide Sphingomyelin und Gangliosid_{GM1} zeigten ebenfalls eine mobile Fraktion von fast 100 %. Die GPI verankerten Marker GFP-GPI und GFP-Thy1 wiesen eine mobile Fraktion von 90 und 92 % auf. Für die Transmembranproteine Dipeptidyl-Transferase und Transferin Rezeptor wurde eine mobile Fraktion von 85 % und 77 % gemessen. Andere FRAP Messungen an den in Mikrodomänen lokalisierten Kv Kanälen Kv 1.4 und Kv 1.3 zeigten eine mobile Fraktion von 80 %. Der ermittelte $t_{1/2}$ Wert lag bei 133 s. Die Anordnung von Proteinen oder Lipiden in Mikrodomänen scheint daher nicht unbedingt an eine eingeschränkte laterale Mobilität gekoppelt zu sein. Für den *raft* lokalisierten Kv 2.1 Kanal wurde dagegen nur eine sehr geringe Mobilität mit einer mobilen Fraktion von 40 % ermittelt (kein vergleichbarer $t_{1/2}$ Wert, da die FRAP Kurve mit einer zweifachen Exponentialfunktion gefittet wurde) (Tamakun *et al.*, 2005). Kv 2.1 zeigt damit wie KAT1 nur eine geringe Beweglichkeit in der PM, die eventuell auf die Lokalisation in Mikrodomänen der PM zurückzuführen ist.

Die beobachtete stabile Positionierung von KAT1 innerhalb der Plasmamembran stimmt auch mit Ergebnissen von Sutter *et al.* (2006) überein, die mit *pulse chase*-Experimenten zeigen konnten, dass sich KAT1 in der PM von Tabak Epidermiszellen über 300 s nicht bewegt. Sutter *et al.* (2006) nehmen an, dass die Unbeweglichkeit von KAT1 in der PM mit

der Interaktion mit einem SNARE zusammenhängt, da sie nachweisen konnten, dass KAT1 nur dann eine hohe Mobilität zeigt, wenn eine Interaktion mit dem SNARE SYP 121 durch die Expression eines dominant-negativen SP2 Fragments des SYP 121 verhindert wird.

Eine weitere mögliche Ursache für die unbewegliche Positionierung von KAT1 in der PM wäre eine (indirekte) Interaktion mit der Zellwand. Eine Interaktion von KAT1 mit der Zellwand wird bereits vermutet, da nachgewiesen werden konnte, dass KAT1 in der PM von Schließzellen in Streifen vorliegt und sich diese Anordnung nach Plasmolyse der Zelle verändert. Nach Replasmolyse der Zelle kehrt KAT1 wieder in die ursprüngliche streifenförmige Anordnung zurückkehrt (Homann *et al.*, 2007). Um den Einfluss der Zellwand auf die Beweglichkeit von KAT1 zu testen, wurden auch FRAP Untersuchungen an tierischen HEK293 Zellen ohne Zellwand durchgeführt.

5.1.3 Laterale Mobilität von KAT1 und HCN4 in der PM von HEK293 Zellen

Der pflanzliche K⁺-Kanal KAT1 zeigt auch in FRAP Experiment in tierischen HEK293 Zellen eine sehr eingeschränkte Beweglichkeit. Für KAT1 in HEK293 Zellen wurde mit einer mobilen Fraktion von durchschnittlich 21 %, im Vergleich zu *Vicia faba* Schließzellen mit einer mobilen Fraktion von 15 %, eine sehr geringe Fluoreszenzrückkehr gemessen. Auch die ermittelten $t_{1/2}$ Werte sind bei KAT1 exprimierenden HEK293 Zellen im Mittel mit 65 s sehr langsam.

Da im HEK293 Zellsystem keine Interaktion mit der Zellwand, wie sie für die pflanzlichen Schließzellen vermutet wurde, möglich ist, kann davon ausgegangen werden, dass eine Interaktion mit der Zellwand nicht den alleinige Grund für die Unbeweglichkeit von KAT1 in der PM darstellt.

Vergleicht man die laterale Mobilität des pflanzlichen K⁺-Kanals KAT1 mit der des sehr ähnlich aufgebauten tierischen K⁺-Kanals HCN4, zeigen beide eine ähnlich eingeschränkte Mobilität in der PM von HEK293 Zellen. Die mobile Fraktion beträgt für HCN4 im Mittel 14 % im Vergleich zu 21 % bei KAT1. Der $t_{1/2}$ Wert liegt für HCN4 im Mittel bei 58 s im Vergleich zu 65 s bei KAT1. Die Fragen, ob diese eingeschränkte Mobilität der beiden Proteine mit der Lokalisation in Mikrodomänen oder der Interaktion mit Sterolen der PM zusammenhängt wird im anschließenden Abschnitt diskutiert.

5.1.3.1 Lokalisation in *lipid rafts* als mögliche Ursache für die Unbeweglichkeit von KAT1 und HCN4 in der PM

Für den tierischen K⁺-Kanal HCN4 wurde über die Aufreinigung von DRMs bereits nachgewiesen, dass der Kanal in Mikrodomänen der PM vorliegt (Barbuti *et al.*, 2004). Für den pflanzlichen K⁺-Kanal KAT1 wird ebenfalls eine Lokalisation in *lipid rafts* vermutet (Sutter *et al.*, 2006). Die langsame und geringe Fluoreszenzrückkehr der beiden Proteine und die ähnliche Mobilität des *raft* Proteins HCN4 unterstützt nun die Vermutung, dass KAT1 mit Mikrodomänen der Plasmamembran assoziiert ist, die seine Mobilität beeinflussen.

Die langsame Fluoreszenzrückkehr von KAT1 ist aber noch kein eindeutiger Beweis für eine Lokalisation in Mikrodomänen der Plasmamembran, da in FRAP Experimenten der gebleichte Bereich wesentlich größer ist, als einzelne Mikrodomänen. Bei einer Fluoreszenzrückkehr müssen *raft*-Proteine daher entweder mit der kompletten Mikrodomäne in die gebleichte Region einwandern oder die Proteine müssten sich dynamisch aus den Domänen lösen und individuell in die gebleichte Region einwandern (Kenworthy *et al.*, 2004). Bei Vergleichen der Fluoreszenzrückkehr von verschiedenen *raft*-Proteinen stellten Kenworthy *et al.* (2004) unterschiedliche Diffusionskoeffizienten von 0,1 bis 1,2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ fest und folgerten daraus, dass sich *raft*-Proteine unterschiedlich schnell innerhalb und zwischen den *rafts* bewegen können. Auch Marguet *et al.* (2006) untersuchten die laterale Mobilität von verschiedenen Membrankomponenten, die in Mikrodomänen vermehrt auftreten können, wie Glycerophospholipide, Sphingolipide, GPI verankerte Proteine und Transmembranproteine über FRAP Messungen. Dabei wurde für die Glycerophospholipide, Phosphatidylcholin und Phosphoethanolamin eine mobile Fraktion von fast 100 % ermittelt, der Diffusionskoeffizient lag bei 1,4 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Die untersuchten Sphingolipide Sphingomyelin und Gangliosid_{GM1} wiesen eine mobile Fraktion von fast 100 % auf. Der Diffusionskoeffizient lag bei 1,2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Die GPI verankerten Marker GFP-GPI und GFP-Thy1 hatten bei einem Diffusionskoeffizienten von 1 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ eine mobile Fraktion von 90 und 92 %. Für die Transmembranproteine Dipeptidyl-Transferase und Transferin Rezeptor wurde bei einem Diffusionskoeffizienten von 0,3 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ und 0,5 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ eine mobile Fraktion von 85 % und 77 % gemessen. Dies macht deutlich, dass Membrankomponenten der Mikrodomänen nicht zwangsläufig eine eingeschränkte Mobilität aufweisen. Es ist daher davon auszugehen, dass eine langsame Fluoreszenzrückkehr keinen eindeutigen Beweis für eine *raft*-Lokalisation darstellt.

Der Einfluss von Sterolen und sterolreichen Mikrodomänen auf die Beweglichkeit der Kanäle kann auch getestet werden, indem die Mikrodomänen durch MBCD an Sterolen verarmt werden. Da Sterole eine wichtige, stabilisierende Komponente der *lipid rafts* sind, wird häufig davon ausgegangen, dass *raft*- und putativ *raft*-assoziierte Proteine nach einer

Sterolverarmung eine höhere Mobilität aufweisen. Bei den FRAP Untersuchungen von KAT1 in der PM von unbehandelten HEK293 Zellen im Vergleich zu MBCD behandelten Zellen ist jedoch kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Die mobile Fraktion beträgt bei KAT1 in der PM von unbehandelten Zellen im Mittel 0,21, die von MBCD behandelten Zellen liegt mit im Mittel 0,18 geringfügig niedriger. Auch für den K⁺-Kanal HCN4 sinkt die mobile Fraktion von im Mittel 0,14 in unbehandelten Zellen auf 0,11 in MBCD behandelten Zellen geringfügig. Eventuell ist die, noch niedrigere Mobilität von KAT1 und HCN4 nach Sterolverarmung auf sekundäre Effekte des MBCD zurückzuführen.

Tatsächlich ist die Behandlung der Zellen mit MBCD nicht ohne Nebenwirkungen. So beobachteten Kwik *et al.* (2003) eine Abnahme der Beweglichkeit des Transmembranproteins HLA in FRAP Experimenten nach der Verarmung der Zellen an Sterol durch MBCD. Sie führen dies darauf zurück, dass MBCD neben den Sterolen der Plasmamembran auch mit den Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interagiert. Dieses Schlüssel-Phospholipid ist vor allem auch an der Regulation und Interaktion mit dem kortikalen F-Aktin beteiligt, so eine MBCD Behandlung auch Auswirkungen auf das Zytoskelett haben kann.

Eine Abnahme der lateralen Mobilität nach MBCD Behandlung wurde auch von Kenworthy *et al.* (2004), sowohl bei *raft*- als auch bei nicht *raft*-Proteinen beobachtet. Ebenso zeigte der ohnehin schon sehr unbewegliche Kv 2.1 Kanal nach Sterolverarmung eine Abnahme der mobilen Fraktion in FRAP Messungen von 40 % auf 30 % (O'Connell *et al.*, 2005).

Eine eindeutige Aussage darüber, ob Sterole die örtliche Positionierung von KAT1 beeinflussen, ist daher anhand der durchgeführten Versuche nicht möglich.

5.1.3.2 Interaktion mit dem Cytoskelett als mögliche Ursache für die Unbeweglichkeit von KAT1

Obwohl KAT1 keine typische Ankyrin Domäne für die Bindung an das Cytoskelett besitzt, könnte die Beweglichkeit des Kanals indirekt über das kortikale Aktin beeinflusst werden. Für den K⁺-Kanal Kv 2.2 konnte bereits nachgewiesen werden, dass er indirekt mit Aktin bindenden Proteinen assoziiert ist (Leonoudakis *et al.*, 2004). Neben einer direkten oder indirekten Verankerung mit dem Cytoskelett kann das kortikale Cytoskelett auch so dicht unterhalb der PM liegen, dass es diese strukturiert und die freie Diffusion von Membranproteinen beeinflusst (Kusumi *et al.*, 2005).

KAT1 zeigte in dieser Arbeit nach Latrunkulin Behandlung, ähnlich wie in unbehandelten Zellen, kaum laterale Mobilität. Die mobile Fraktion war mit 0,21 ohne und mit 0,27 nach der Latrunkulin B Behandlung sehr gering. Der für $t_{1/2}$ ermittelte Wert war nach der

Latrunkulin B Behandlung mit 50 s geringfügig schneller als bei unbehandelten Zellen mit 66 s.

Da durch den Aktin Inhibitor Latrunkulin B keine schnellere oder größere laterale Beweglichkeit von KAT1 induziert werden konnte, ist nicht davon auszugehen, dass das Aktincytoskelett eine wesentliche Rolle bei der Positionierung von KAT1 in der Plasmamembran spielt.

5.1.4 Lokale Mobilität des KAT1 im ER

Aufgrund der oben genannten technischen Limitierung des Leica SP Mikroskops wird hier nur auf die am Leica SP_2 Mikroskop gewonnenen Daten eingegangen. Obwohl die eigentlichen Bleichparameter, wie Laserintensität und Bleichdauer gleich gehalten wurden, sind am SP_2 andere Bedingungen gegeben. Am Leica SP_2 Mikroskop ist es möglich, exakt gleich große, definierte Bleichbereiche zu legen. Außerdem wurde die Umgebungstemperatur der Zellen am SP_2 in einer Inkubatorbox auf 37°C gehalten. Bei den Messungen am SP Mikroskop lag die Umgebungstemperatur bei 20°C. Wie Kenworthy *et al.* (2004) zeigen konnten, hat gerade die Temperatur einen erheblichen Einfluss auf die Diffusionseigenschaften. Sie stellten fest, dass bei 20 °C, im Vergleich zu 37 °C, der Diffusionskoeffizient etwa um das zweifache gesenkt wurde.

Obwohl die absoluten Messwerte daher nicht mit denen des Leica SP Mikroskops verglichen werden können, ist doch ein qualitativer Vergleich zwischen ER und PM lokalisiertem KAT1 möglich. Es ist hier festzuhalten, dass der Kanal auch im ER eine eingeschränkte Mobilität zeigt, die sich in einer relativ geringen mobilen Fraktion von 0,29 äußert. Eine Erklärungsmöglichkeit für diese eingeschränkte Mobilität in der Membran des ERs könnte sein, dass KAT1 sich schon im ER in seiner entsprechenden Lipidumgebung befindet. Nach Runz *et al.* (2006) spielen Sterole in der Hefe eine wichtige Funktion bei der Formierung von *ER export sites* (ERES), die wiederum für die Sortierung des Cargos in COPII Vesikel wichtig sind. Auch die Lokalisation der KAT1 ER-Exportmutante deutet auf eine räumliche Begrenzung des KAT1 auf ERES innerhalb des ERs hin (Sieben *et al.*, 2008).

Abschließend ist fest zu halten, dass auch mit den FRAP Messungen zur Bestimmung der lateralen Mobilität von KAT1 nicht eindeutig geklärt werden konnte, welche Faktoren für seine räumlichen Positionierung und Unbeweglichkeit in der PM und im ER verantwortlich sind.

5.2 Räumliche Anordnung von KAT1 und anderen Membranproteinen innerhalb der PM

Für den K⁺-Kanal KAT1 wurde bereits in mehreren Arbeiten eine Lokalisation in Clustern innerhalb der PM berichtet. Bei heterologer Expression in *Vicia faba* Schließzellen zeigt der Kanal eine Verteilung in radiären Streifen, die sich aus vielen Clustern zusammensetzen. In Epidermiszellen zeigt er eine Verteilung in unregelmäßig angeordneten Clustern (Homann *et al.*, 2007). Von einer Lokalisation in Clustern wurde auch in *Vicia faba* Schließzellprotoplasten (Hurst *et al.*, 2004) und Tabak Epidermiszellen und Protoplasten (Sutter *et al.*, 2006) berichtet. In der vorliegenden Arbeit konnten die KAT1 Cluster auch in tierischen HEK293 und CHO-K1 Zellen gezeigt werden. Die Clusterbildung des pflanzlichen KAT1 Kanals ist also nicht auf pflanzliche Expressionssysteme beschränkt und beruht daher wahrscheinlich auf Faktoren, die in beiden Systemen vorhanden sind.

Für den sehr ähnlich aufgebauten spannungsabhängigen K⁺-Kanal HCN4 ist bekannt, dass auch er in Clustern innerhalb der PM vorliegt. Da HCN4 in DRMs nachgewiesen wurde, ist es naheliegend, dass seine Lokalisation in Clustern oder Mikrodomänen auf den Einfluss von Sterolen innerhalb dieser Mikrodomänen zurückzuführen ist (Barbuti *et al.*, 2004). Von einem Einfluss der Sterole auf die Verteilung und Größe der Clusterstrukturen des spannungsregulierten Kv 2.1 Kanals und des spannungsabhängigen Kv 1.5 Kanals berichten auch O’Connel und Tamakun (2005) sowie Abi-Char *et al.* (2007). Daher wurde auch der Einfluss von Sterolen auf die Verteilung des KAT1 in dieser Arbeit untersucht. Auch KAT1 zeigte eine veränderte Verteilung der Cluster in der Membran von HEK293 Zellen nach einer Sterolverarmung. Die Cluster zeigten nach der Sterolverarmung eine diffusere Verteilung und waren weniger gegeneinander abgegrenzt. Daher ist anzunehmen, dass auch die Verteilung von KAT1 in der PM von HEK293 Zellen durch Sterole stabilisiert wird. Diese Stabilisierung der Verteilung durch Sterole stärkt wiederum die Annahme, dass KAT1 in sterolhaltigen Mikrodomänen der PM lokalisiert ist.

Um die Lokalisation von KAT1 in Mikrodomänen der PM genauer zu untersuchen, wurde der Kanal in *S. cerevisiae* exprimiert. In diesem System sind die Mikrodomänen der PM bereits gut charakterisiert. Um die richtige Sortierung und Funktionalität des KAT1::GFP Konstrukts in Hefe zu überprüfen, wurde ein Komplementationstest durchgeführt. KAT1::GFP komplementierte dabei die K⁺-Aufnahme des SGY1528 Hefestamms, dessen endogenes K⁺-Aufnahmesystem deletiert ist. Folglich wird das KAT1::GFP Fusionskonstrukt in Hefe korrekt sortiert, in die PM integriert und liegt dort auch funktional vor.

Die Lokalisation des KAT1::GFP wurde auch in Hefe am CLSM untersucht und mit anderen Membranproteinen verglichen. Auch in Hefe ergab sich für KAT1 eine Verteilung in punktförmigen Clustern innerhalb der PM, wie sie auch in pflanzlichen und tierischen Expressionssystemen vorliegen. Die Größe der Cluster lag zwischen 50 nm und 550 nm, wobei der größte Anteil der Cluster eine Größe von etwa 250 nm hatte. Dies entspricht genau der Größe der KAT1 Cluster, wie sie in *Vicia faba* Schließzell-Protoplasten beobachtet wurden (Hurst *et al.*, 2004). Von einer Clusterbildung in 200 nm bis 300 nm großen *raft*-ähnlichen Mikrodomänen der PM wird zum Beispiel auch für den in DRMs lokalisierten Sukrose Transporter SUT1 berichtet (Krügel *et al.*, 2008). Auch dies unterstützt die These, dass KAT1 in Mikrodomänen der PM lokalisiert ist.

Bei einem Vergleich der Lokalisation von KAT1 mit anderen Membranproteinen in Hefe wird deutlich, dass es generell Membranproteine gibt, die a) nur homogen, b) nur in Clustern, oder c) durch externe Faktoren beeinflusst in Clustern oder homogen in der PM vorliegen können. Die beobachtete Lokalisation war nicht von der Funktion des Proteins abhängig. Der Tandem K⁺-Kanal TOK1 zeigte sich homogen verteilt. Der K⁺-Kanal rEAG1 und der Hexose Symporter waren, abhängig von der Osmolarität, sowohl homogen verteilt als auch in Clustern lokalisiert. Der K⁺-Kanal KAT1 und das Membranprotein SUR7 zeigten eine Lokalisation in Clustern.

Um die KAT1 Cluster in der PM von *S. cerevisiae* weiter zu charakterisieren, wurde untersucht, ob KAT1 in den sterolreichen MCC Domänen der PM lokalisiert ist. Ein Test auf Kolokalisation des MCC Markerproteins SUR7::mRFP mit KAT1 ::GFP zeigte jedoch, dass KAT1 und SUR7 nicht innerhalb der selben Bereiche vorliegen, und es maximal zu einer partiellen Überlagerung der Lokalisation von KAT1 und SUR7 kommt. Diese Lokalisation von KAT1 außerhalb der sterolreichen MCC Domänen könnte darauf hindeuten, dass KAT1 bevorzugt in den invers verteilten MCP Domänen vorliegt, wie es für die Pma1 gezeigt wurde (Grossmann *et al.*, 2007). Die Lokalisation von Pma1 innerhalb der MCP Domänen ist vor allem durch die dort lokalisierten Sphingolipide beeinflusst (Gaigg *et al.*, 2005), die neben Sterolen auch in Mikrodomänen der tierischen und pflanzlichen PM gehäuft auftreten. Es ist daher vorstellbar, dass die Lokalisation von KAT1 in Clustern oder Mikrodomänen neben den Sterolen auch durch die dort vorliegenden Sphingolipide beeinflusst wird.

Die in allen Expressionssystemen beobachtete Lokalisation von KAT1 in Clustern innerhalb der PM, an der wahrscheinlich Sterole beteiligt sind, führt zu der Frage, ob diese Verteilung in Clustern eine physiologische Funktion hat. Derzeit ist die Funktion der Cluster für den KAT1 noch nicht geklärt. Aufgrund von Beobachtungen an anderen *raft*-lokalisierten Proteinen können hier aber Vermutungen angestellt werden. Es wäre zum

Beispiel vorstellbar, dass die Lokalisation in Mikrodomänen einen Einfluss auf die Aktivität und Funktionalität des KAT1 hat. So könnte der Kanal entweder indirekt über die Lipidumgebung der Domänen oder über den dort stabilisierten Kontakt zu anderen Proteinen beeinflusst sein. Für den Kationenkanal HCN4 ist bekannt, dass eine Sterolverarmung der Membran die Kinetik des Kanals beeinflusst (Barbuti *et al.*, 2004). Für den spannungsabhängigen Kv 1.5 Kanal konnte nachgewiesen werden, dass eine Sterolverarmung der Membran zu einer erhöhten Leitfähigkeit in *patch clamp* Messungen führt. Auch der Kv 2.1 Kanal zeigt nach Sterolverarmung andere Inaktivierungseigenschaften (Tamkun *et al.*, 2004). Weiterhin unterliegt gerade die Anzahl an aktiven Kanälen und Transportern in der PM einer akkuraten Regulation, die jedoch auch eine schnelle Anpassung an geänderte Bedingungen zulassen muss. Eine solche Regulation ist zum Beispiel auch auf der Ebene des Traffickings von und zur PM möglich, die die Dichte der Kanäle und Transporter an der Membran regulieren kann. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, dass Mikrodomänen der Membran auch Auswirkungen auf Endo- und Exocytose haben. So konnte gezeigt werden, dass *lipid rafts* an Clathrin unabhängiger Endocytose beteiligt sind (Helms and Zurzola, 2004) und eine Sterolverarmung eine stark reduzierte Clathrin vermittelte Endocytose des Wachstumsfaktors EGF bewirkt (Rodal *et al.*, 1999). Daneben wird für pflanzliche Zellen eine Beteiligung von Mikrodomänen der PM an sogenannten Recycling-Domänen beschrieben, an denen Exo- und Endocytose stattfinden (Žárský *et al.*, 2009) und für die in Hefe MCC Domänen lokalisierten Proteine wird ein Schutz vor Endocytose diskutiert (Grossmann *et al.*, 2008). Daher wäre es möglich, dass die Lokalisation des KAT1 in Mikrodomänen der PM auch einen Einfluss auf die Regulation der Kanaldichte an der Membran über Exo- und Endocytose hat.

5.3 Faktoren die zur Clusterbildung und Stabilisierung beitragen

Im nächsten Abschnitt sollen Faktoren erörtert werden, die KAT1 Cluster innerhalb der PM beeinflussen könnten. Das Membranpotential wurde von Grossmann *et al.*, (2007) als ein Faktor beschrieben, der die Lokalisation von Membranproteinen in Mikrodomänen beeinflussen kann. Von Schäfer und Thiele (2004) wurde am *lipid bilayer* System gezeigt, dass das Membranpotential einen Einfluss auf die Phasenseparation innerhalb der Membran hat. Die Depolarisation der Membran wurde in dieser Arbeit durch eine erhöhte K⁺-Konzentration im Außenmedium induziert (Gaskova *et al.*, 1999), die keine störenden sekundären Effekte in der Zelle auslöst.

Obwohl eine Depolarisation des Membranpotentials über die externe K⁺-Konzentration in spektralphotometrischen Messungen eindeutig nachgewiesen werden konnte, führte die

induzierte Depolarisation weder bei KAT1 noch bei HUP1 zu einer Veränderung der Proteinverteilung. KAT1 zeigte in allen untersuchten K^+ -Konzentration eine Lokalisation in Clustern innerhalb der PM. Auch die Größenverteilung der beobachteten Cluster änderte sich für KAT1 nach induzierter Depolarisation nicht. Für den Hexose Symporter HUP1 hatten Grossmann *et al.* (2007) eine Abhängigkeit der Lokalisation vom Membranpotential beschrieben. Demnach sollte der in Clustern lokalisierte Symporter HUP1 nach einer Depolarisation der Membran eine homogene Verteilung aufweisen. Diese Abhängigkeit der Verteilung von HUP1 vom Membranpotential konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Es ergab sich vielmehr, dass die Lokalisation von HUP1 in Clustern nur unter hoher Osmolarität des Außenmediums zu beobachten war. Daher wurde auch die Auswirkung der Osmolarität auf die Lokalisation von KAT1 und anderen Membranproteinen untersucht. Dabei zeigte sich deutlich, dass die Osmolarität des umgebenden Mediums durchaus die Lokalisation von Membranproteinen beeinflussen kann, wobei die Abhängigkeit der Lokalisation nicht an die Funktion des Proteins gekoppelt war. Ein Einfluss der Osmolarität auf die Lokalisation wurde zum einen für den Hexose Symporter HUP1 und zum anderen für den K^+ -Kanal rEAG1 dargestellt. HUP1 und rEAG1 waren nach Überführung in Medium mit niedriger Osmolarität homogen verteilt. Bei einer Überführung in Medium mit höherer Osmolarität (ab etwa 1 osmol/kg) zeigten sie eine Lokalisation in Clustern innerhalb der PM, während die K^+ -Kanäle KAT1 und TOK1 bei Überführung in Medien mit unterschiedlich hoher Osmolarität keine Veränderung der Lokalisation aufwiesen. KAT1 war sowohl bei niedriger, als auch bei hoher Osmolarität in Clustern angeordnet. Auch die Auswertung der Clustergröße bei unterschiedlichen Osmolaritäten erbrachte keine Unterschiede zwischen hohen und niedrigen Osmolaritäten. TOK1 war in Medien mit unterschiedlichen Osmolaritäten immer homogen verteilt. Besonders interessant scheint dabei zu sein, dass es Proteine wie den KAT1 gibt, die permanent in Clustern vorliegen und andere wie HUP1 und rEAG1, deren Clusterbildung durch hohe Osmolarität induziert werden kann. Von HUP1 ist bekannt, dass er, ebenso wie das Markerprotein SUR7, in MCC Domänen lokalisiert ist (Grossmann *et al.*, 2007). Wie in dieser Arbeit bereits beschrieben, sind KAT1 und SUR7 größtenteils nicht in den selben Mikrodomänen der PM lokalisiert. Damit ist davon auszugehen, dass sich auch KAT1 und HUP1 nicht in den selben Mikrodomänen der PM anordnen. Es ist also möglich, dass diese unterschiedliche Lokalisation von KAT1 und HUP1 auch zu einem unterschiedlichen Effekt der Osmolarität auf die Verteilung der Membranproteine führt.

Es stellt sich die Frage ob die homogene Verteilung des HUP1, ausgehend von einer ursprünglichen Verteilung in Clustern, durch hypoosmotische Bedingungen ausgelöst wurde, oder ob die Anordnung in Clustern, ausgehend von einer homogenen Verteilung,

durch hyperosmotische Bedingungen verursacht wurde. Für die Induktion einer homogenen Verteilung durch hypoosmotische Bedingungen könnte angeführt werden, dass unter hypoosmotischen Bedingungen mehr Druck auf der Lipiddoppelschicht der Membran wirkt. Ein erhöhter Druck kann dazu führen, dass sich die ungesättigten Fettsäurerester der Lipide der L_d -Phase stärker ordnen, wodurch sie der L_o -Phase ähnlicher werden. Dies kann sogar dazu führen, dass sich die Unterschiede in der Membrandicke zwischen der L_d - und L_o -Phase angleichen (Schäfer und Thiele, 2004). Eine Angleichung der Membrandicke unter hypoosmotischen Bedingungen wäre damit ein Argument für die homogene Verteilung des HUP1. Weiterhin wird unter hypoosmotischen Bedingungen vermehrt die Sterolsynthese induziert. Durch die damit verbundene flexiblere Membran kann vermehrt Glycerol als Osmoprotectant ins Medium abgegeben werden (Toh *et al.* 2001). Auch durch den vermehrten Einbau von Sterolen in die Membran könnten sich die Eigenschaften der Membran den Sterol assoziierten MCC Domänen angleichen, was wiederum die homogene Verteilung des MCC lokalisierten HUP1 begünstigen könnte. Allerdings benötigt die Sterolsynthese auch Zeit, wodurch diese Erklärung für den hier beobachteten Fall eher nicht zutrifft. Außerdem wurde unter isoosmotischen Bedingungen, in Medium mit einer Osmolarität zwischen 0,5 und 0,7 osmol/kg, eine homogene Verteilung des Transporters beobachtet. Daher liegt es nahe, dass eine Lokalisation von HUP1 in Clustern auf einen hyperosmotischen Schock zurückzuführen ist. Es konnte auch beobachtet werden, dass die Lokalisation von HUP1 in Clustern nach dem osmotischen Schock nur vorübergehend ist. Wurden die HUP1 exprimierenden Zellen über einen längeren Zeitraum (24 h) in Medium mit hoher Osmolarität inkubiert und blieb ihnen damit genug Zeit zur Osmoregulation, so konnte wieder eine homogene Verteilung des HUP1 beobachtet werden. Interessanterweise konnten bereits unter osmotischem Stress und damit einhergehender Plasmolyse Veränderungen in der Ultrastruktur der PM elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (Niedermeyer *et al.*, 1977). Dabei zeigte die plasmolysierte PM ab 0,7 bis 1,2 M Sorbitol vesikelartige Einfaltungen. Da HUP1 auch ab etwa 1 M Sorbitol eine Lokalisation in Clustern zeigte, kann vermutet werden, dass die am CLSM beobachteten Cluster innerhalb der Membran auf solche osmotisch bedingten ultrastrukturellen Einfaltungen der Membran zurückzuführen sind.

Für den K^+ -Kanal KAT1 wird, wie oben besprochen eine Lokalisation in Mikrodomänen der PM angenommen. Da sich die Mikrodomänen vor allem durch einen hohen Anteil an Sterolen auszeichnen, sollte der Einfluss von Sterolen auf die Lokalisation von KAT1 untersucht werden. Die Expression des KAT1 im Δ erg6 Hefestamm, dessen Sterolsynthese blockiert ist, zeigte jedoch trotzdem eine Verteilung des KAT1 in Clustern, obwohl davon ausgegangen werden muss, dass sich in diesem Hefestamm, aufgrund der geänderten

Membranzusammensetzung, keine der üblicherweise beobachteten Mikrodomänen ausbilden können. Die Bestimmung der Clustergröße ergab aber doch einen kleinen Unterschied im Vergleich zu den im Wildtyp beobachteten Clustern. In der Δ erg6 Mutante konnten keine Cluster mit einem Durchmesser von mehr als 350 nm beobachtet werden. Im Wildtyp traten dagegen vereinzelt auch größere Cluster mit einem Durchmesser von bis zu 550 nm auf. In der Δ erg6 Mutante waren deutlich weniger große Cluster vorhanden. Dies zeigt, dass die Sterole der PM einen, wenn auch geringen, Einfluss auf die Lokalisation des KAT1 in der PM haben. Die Sterole scheinen aber nicht der grundlegende Faktor zu sein, der eine generelle Lokalisation des KAT1 in Clustern bewirkt. Dies bestätigten auch zwei der zuvor beschriebenen Beobachtungen. Zum einen konnte in FRAP Messungen keine vermehrte Mobilität des KAT1 nach einer Sterolverarmung der Membran nachgewiesen werden und zum anderen ergab sich keine Kolo­kalisierung mit dem Markerprotein SUR7, das in den Sterol assoziierten MCC Domänen lokalisiert ist. Allerdings reagieren auch verschiedene MCC lokalisierte Proteine unterschiedlich auf die Expression in der Δ erg6 Mutante. So berichten Grossmann *et al.*, (2008), dass sich die MCC lokalisierten Proteine HUP1 und Can1 in der Δ erg6 Mutante homogen anordnen, das SUR7 Protein jedoch eine mit KAT1 vergleichbare Anordnung in Clustern aufweist.

Auch eine Interaktion mit der Zellwand kann als Stabilisierungsfaktor eine Anordnung von Membranproteinen in Clustern beeinflussen. Für das MCC lokalisierte Protein SUR7, das wahrscheinlich auch eine Funktion in der Regulation der Zellwandsynthese hat (Alvarez *et al.*, 2008) wurde berichtet, dass das in Clustern angeordnete Protein nach Verdau der Zellwand eine homoge Verteilung einnimmt (Young *et al.*, 2002). Aufgrund der räumlichen Reorganisation des KAT1 von einer streifenförmigen Anordnung der Cluster in intakten *Vicia faba* Schließzellen hin zu einer zufälligen Verteilung der Cluster in zellwandlosen Protoplasten, wurde auch schon für KAT1 eine mögliche Interaktion mit der Zellwand diskutiert (Homann *et al.*, 2007). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zeigen keinen direkten Effekt des Verdau der Zellwand auf die Lokalisation von KAT1. Im Gegensatz zu SUR7 wurde für KAT1 keine homogene Verteilung in Protoplasten beobachtet. Dies stimmt auch mit der Verteilung des KAT1 in pflanzlichen Protoplasten (Hurst *et al.*, 2004; Sutter *et al.*, 2006) und der Lokalisation in zellwandlosen HEK293 und CHO-K1 Zellen überein.

Wurden jedoch die beiden stabilisierenden Faktoren Sterole und Zellwand durch Protoplastierung von KAT1 exprimierenden Δ erg6 Hefezellen entfernt, so konnte eine homogene Verteilung des KAT1 in der PM gezeigt werden. Dies spricht dafür, dass die Lokalisation von KAT1 in Clustern oder Mikrodomänen der PM mindestens durch die beiden stabilisierende Faktoren Sterole und Zellwand bedingt ist. Erst wenn beide

Faktoren nicht mehr gegeben sind, kommt es zu einer homogenen Verteilung des KAT1 in der PM. Ob diese Stabilisierung des Kanals dabei direkt über eine Interaktion mit Sterolen oder Komponenten der Zellwand erfolgt, oder ob es sich über eine indirekte Interaktion und Positionierung handelt, ist dabei noch nicht geklärt.

6 Referenzen

- Abi-Char J**, Maguy A, Coulombe A, Balse E, Ratajczak P, Samuel J L, Nattel S, Hatem S N. (2007) Membrane cholesterol modulates Kv1.5 subunit distribution and Kv1.5-based channel function in rat cardiomyocytes. *J Physiol* 582: 1205–1217
- Alvarez FJ**, Douglas L M, Rosebrock A, Konopka J B. (2008) The Sur7 protein regulates plasma membrane organization and prevents intracellular cell wall growth in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the cell* 19: 5214–5225
- Alvarez F J**, Douglas L M and Konopka J B. (2009) The Sur7 protein resides in punctate membrane subdomains and mediates spatial regulation of cell wall synthesis in *Candida albicans*. *Communicative and Integrative Biology* 2 (2): 76–77
- Axelrod D**, Koppel E, Schlessinger J, Elson E and Webb W. (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J.* 16(9): 1055–1069
- Bagnat M**, Keranen S, Shevchenko A and Simons K. (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 7: 3254–9
- Balß J**. (2007) Unterschiedliche zelluläre Sortierung zweier viraler K⁺-Kanäle. Dissertation: Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt, 2007
- Barbuti A**, Gavante B, Riolfo M, Milanesi R, Terragni B, Di Francesco D. (2004) Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circ. Res.* 10: 1325–31
- Bertl A**, Bihler H, Kettner K and Slaymann C L. (1998) Electrophysiology in the eukaryotic model cell *Saccharomyces cerevisiae*. *Pflügers Arch* 436(6):999–1013
- Borner G H**, Sherrier D J, Weimar T, Michaelson L V, Hawkins N D, Macaskill A, Napier J A, Beale M H, Lilley K S, Dupree P. (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* 137: 104–116
- Brown D A** and Rose J K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68(3): 533–44
- Brown D A** and London E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111–36
- Brown D A**. (2006) Lipid Rafts, Detergent-Resistant Membranes, and Raft Targeting Signals. *Physiology* 21: 430–439
- Christian A E**, Haynes M P, Phillips M C and Rothblat G H. (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid. Res.* 38: 2264–2272
- De Risi J L**, Iyer V R, and Brown P O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278:680–686
- Edidin M**. (2003) The state of lipid rafts: From Model Membranes to Cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32: 257–283
- Ehrhardt T**, Zimmermann S and Müller-Rober B. (1997) Association of plant K⁺(in) channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. *FEBS Lett* 409(2): 166–170
- Fantini J**, Garmy N, Mahfoud R and Yahi N. (2002) Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Reviews in Molecular Medicine* Cambridge University Press 1462–3994

- Gaigg B**, Timischl B, Corbino L and Schneiter R (2005). Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required routing of newly synthesized plasma membrane ATPase to the cell surface of yeast. *J Biol Chem* 280(23): 22515-22
- Gamper N**.(2005) The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *J Pharmacol Toxicol Methods*. (3):177-85
- Garcia A**, Cayla X, Fleischer A, Guernon J, Canas FAF, Rebollo M P, Roncal F and Rebollo A. (2003) Rafts: a simple way to control apoptosis by subcellular redistribution. *Biochimie* 85: 727-731
- Gaskova D**, Brodska B, Holoubek A and Sigler K. (1999). Factors and processes involved in membrane potential build-up in yeast: diS-C3(3) assay. *Int J Biochem Cell Biol* 31(5): 575-84
- Giaever G**, Chu A M, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, Dow S, Lucau- Danila A, Anderson K, Andre B, Arkin A P, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418(6896): 387-91
- Goffeau A**, Barrell B G, Bussey H, Davis R W, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel J D, Jacq C, Johnston M, Louis E J, Mewes H W, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver S G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* (5287):546-563-7
- Graham F L**, Smiley J, Russell W C and Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59-72
- Grossmann G**, Opekarova M, Novakova L, Stolz J, Tanner W. (2006) Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 5: 945-953
- Grossmann G**, Opekarova M, Malinsky J, Weig-Meckl I and Tanner W. (2007). Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J* 26(1): 1-8
- Grossmann G**, Malinsky J, Stahlschmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer W. B, Opekarová M, and Tanner W.(2008) Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *The Journal of Cell Biology* 183 (6) 1075-1088
- Hanahan D**. (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: *DNA Cloning*. Volume I, a practical approach. Glover, D. M. (ed.). Oxford. 109-135
- Heberle F A**, Buboltz J T, Stringer D, and Feigenson G W. (2005) Fluorescence methods to detect phase boundaries in lipid bilayer mixtures. *Biochim Biophys Acta* 1746: 186-192
- Heginbotham L**, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *The Biophysical Journal* 66(4):1061-1067
- Helms J B**, Zurzolo C. (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*. 5:247-254
- Hitzeman R A**, Hagie F E, Levine H L, Goeddel D V, Ammerer G and Hall B D.(1981) Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature* 293(5835): 717-22
- Hobman T C**, Zhao B, Chan H and Farquhar M G. (1998). Immunoisolation and characterization of a subdomain of the endoplasmic reticulum that concentrates proteins involved in COPII vesicle biogenesis. *Mol. Biol. Cell* 9: 1265-1278
- Homann U**, Meckel T, Hewing J, Hutt M T, Hurst A C. (2007) Distinct fluorescent pattern of KAT1::GFP in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *European Journal of Cell Biology* 86 (8): 489-500

- Hosy E**, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Poree F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very A A, Simonneau T, Thibaud J B, and Sentenac H. (2003) The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(9): 5549–5554
- Hurst A C**, Meckel T, Homann U and Thiel G. (2004) Trafficking of the plant potassium inward rectifier KAT1 in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant J.* 37 (3): 391–397
- Ilangumaran S** and Hoessli C D. (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.* 335: 433–440
- Kenworthy A K**, Nichols B J, Remmert C L, Hendrix G M, Kumar M, Zimmerberg J and Lippincott-Schwartz J. (2004) Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J. Cell Biol.* 165:735–46
- Kirchhoff H**. (2008) Molecular crowding and order in photosynthetic membranes. *Trends in Plant Science* 13 (5) 201–207
- Krügel U**, Veenhoff L M, Langbein J, Wiederhold E, Liesche J, Friedrich T, Grimm B, Martinoia E, Poolman B, Kühn C. (2008) Transport and sorting of the *Solanum tuberosum* sucrose transporter SUT1 is affected by posttranslational modification. *Plant Cell* 20: 2497–2513
- Kübler E**, Dohlman H G and Lisanti M P. (1996). Identification of Triton X-100 insoluble membrane domains in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Lipid requirements for targeting of heterotrimeric G-protein subunits. *J Biol Chem* 271(51): 32975–80
- Kusumi A**, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J, Fujiwara T. (2005) Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 34:351–78
- Kusumi A** & Suzuki S.(2005) Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1746: 234–251
- Kwik J**, Boyle S, Fooksman D, Margolis L, Sheetz M P, and Edidin M. 2003. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:13964–13969
- Lenne P F**, Wawrezynieck L, Conchonaud F, Wurtz O, Boned A, Guo X J, Rigneault H, He H T, Marguet D. (2006) Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *EMBO J* 25: 3245–3256
- Leonoudakis D**, Conti L R, Anderson S, Radeke C M, Mc Guire L M M, Adams M E, Froehner S C, Yates J R, and Vandenberg C A. (2004). Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 279: 22331–22346
- Ludwig A**, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* 18:2323–2329
- Malinska K**, Malinsky J, Opekarova M and Tanner W. (2003). Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol Biol Cell* 14 (11) : 4427–36
- Maxfield F R**. (2002) Plasma membrane microdomains. *Current Opinion in Cell Biology* 14 (4): 483–487
- Meiri K F**. (2005) Lipid rafts and regulation of the cytoskeleton during T cell activation. *Phil. Trans. R. Soc.* 360: 1663–1672

- Mikosch M**, Hurst A C, Hertel B, Homann U. (2006) Diacidic motif is required for efficient transport of the K⁺ channel KAT1 to the plasma membrane. *Plant Physiology* 142:923-930
- Minami A**, Fujiwara M, Furuto A, Fukao Y, Yamashita T, Kamo M, Kawamura Y and Uemura M. (2009) Alterations in Detergent-Resistant Plasma Membrane Microdomains in *Arabidopsis thaliana* During Cold Acclimation. *Plant and Cell Physiology* 50(2):341-359
- Mongrand S**, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde J P, Hartmann M A, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule J J. (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem* 279: 36277–36286
- Nakamura R L**, Mc Kendree W, Hirsch R E, Sedbrook J C, Caber R F and Sussman M R. (1995) Expression of an *Arabidopsis* Potassium Channel Gene in Guard Cells. *Plant Physiol* 109: 371-374
- Niedermeyer W**, Parish G R and Moor H. (1977). Reactions of yeast cells to glycerol treatment. Alterations to membrane structure and glycerol uptake. *Protoplasma* 92(3-4): 177-93
- O'Connell K M**, Tamkun M M. (2005) Targeting of voltage-gated potassium channel isoforms to distinct cell surface microdomains. *J Cell Sci.* 118:2155-66
- Opekarová M** and Tanner W. (2003) Specific lipid requirements of membrane proteins—a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1610 (1):11-22
- Parton R G** and Richards A A. (2003) Lipidrafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 4: 724–738
- Phair R D**, Gorski S A and Mistel T. (2004) Measurement of dynamic protein binding to chromatin in vivo, using photobleaching microscopy. *Methods Enzymol.* 375: 393–414
- Plowman J**, Muncke C, Parton G, and Hancock F. (2005) H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15500–15505
- Poo M** and Cone R A. (1974) Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. *Nature* 247: 438–441
- Pralle A**, Keller P, Florin E L, Simons K and Horber J K. (2000). Sphingolipidcholesterolrafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 148(5): 997-1008
- Pucadyil T J**, Chattopadhyay A. (2006) Effect of cholesterol on lateral diffusion of fluorescent lipid probes in native hippocampal membranes. *Chemistry and physics of lipids* 143 (1-2): 11-21
- Puck T T**. (1957) The genetic of somatic mammalian cells. *Adv. Biol. Med. Phys.* 5: 75- 101
- Rajendran L** and Simons K. (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118: 1099-102
- Rep M**, Krantz M, Thevelein J M and Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J. Biol. Chem.* 275:8290–8300
- Rietveld A** and Simons K. (1998) The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta* 1376(3): 467-79

- Roche Y**, Gerbeau-Pissot P, Buhot B, Thomas D, Bonneau L, Gresti J, Mongrand S, Cornet J and Simon-Plas F. (2008) Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *The FASEB Journal* 22:3980-3991
- Rodal S K**, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B. and Sandvig K. (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell*. 10:961-974
- Rosenberger C M**, Brumell J H and Finlay B B. (2000) Microbial pathogenesis: lipidrafts as pathogen portals. *Curr. Biol.* 10: R823-R825
- Runz H**, Miura K, Weiss M and Pepperkok R. (2006) Sterols regulate ER-export dynamics of secretory cargo protein ts-O45-G. *EMBO J.* 25(13): 2953-2965
- Salaun C**, James D J, Chamberlain L H. (2004) Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic* 5: 255-264
- Schachtman D P**, Schroeder J I, Lucas W J, Anderson J A and Gaber R F. (1992) Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science* 258:1654-1658
- Schäffer E**, Thiele U. (2004) Dynamic domain formation in membranes: thickness-modulation-induced phase separation. *Eur Phys J E* 14: 169-175
- Schroeder R**, London E und Brown D. (1994) Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12130-12134
- Sieben C**, Mikosch M, Brandizzi F, Homann U. (2008) Interaction of the K(+)-channel KAT1 with the coat protein complex II coat component Sec24 depends on a di-acidic endoplasmic reticulum export motif. *Plant J.* 56(6):997-1006
- Simons K**, Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-72
- Simons K** and Toomre D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1: 31-39
- Singer S J** and Nicolson G L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175(23): 720-31
- Sivadon P**, Peypouquet M F, Doignon F, Aigle M, Crouzet M. (1997) Cloning of the multicopy suppressor gene SUR7: evidence for a functional relationship between the yeast actin-binding protein Rvs167 and a putative membranous protein. *Yeast* 13:747-61
- Stadler R**, Wolf K, Hilgarth C, Tanner W, Sauer N. (1995) Subcellular Localization of the inducible *Chlorella* HUP1 monosaccharide-H⁺ symporter and cloning of a co-induced galactose-H⁺ symporter. *Plant Physiol.* 107: 33 - 41
- Sutter J U**, Campanoni P, Tyrrell M and Blatt M. (2006) Selective Mobility and Sensitivity to SNAREs Is Exhibited by the Arabidopsis KAT1 K⁺ Channel at the Plasma Membrane. *The Plant Cell* 18: 935-954
- Szyroki A**, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema M R, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K, and Hedrich R. (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(5): 2917-2921
- Tang W**, Ruknudin A, Yang W P, Shaw S Y, Knickerbocker A and Kurtz S. (1995) Functional expression of a vertebrate inwardly rectifying K channel in yeast. *Mol Biol Cell* 6:1231-1240
- Tsukita S**, Yonemurab S and Tsukita S. (1997) ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends in Biochemical Sciences* 22 (2):53-8

- Toh T H**, Kayingo G, van der Merwe M J, Kilian S G, Hallsworth J E, Hohmann S and Prior B A. (2001) Implications of FPS1 deletion and membrane ergosterol content for glycerol efflux from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 1(3): 205-11
- Umebayashi K** and Nakano A. (2003) Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J Cell Biol* 161(6): 1117-31
- Verkleij A J**, Zwaal R F, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen L L. (1973) The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta*. 323(2):178-93
- Viola A** & Gupta N.(2007) Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nature Reviews Immunology* 7: 889-896
- Walther T C**, Brickner J H, Aguilar P S, Bernales S, Pantoja C and Walter P. (2006) Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439(7079): 998- 1003
- Wirth V**, List I, Diez G, Ziegler W H and Goldmann W H.(2009) In vitro characterization of vinculin's lipid membrane-interacting domain, helix 3. *Biophysical Journal* 96 (3): 329a-329a
- Wong W** and Schlichter L C. (2003) Differential Recruitment of Kv1.4 and Kv4.2 to Lipid Rafts by PSD-95. *The Journal Of Biological Chemistry* 279: 444-452
- Xu S H**, Nes W D. (1988) Biosynthesis of cholesterol in the yeast mutant *erg6*. *Biochem-Biophys-Res-Commun.* 155(1): 509-17
- Xu X**, Bittman R, Duportail G, Heissler D, Vilcheze C and London E. (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide. *J Biol Chem* 276(36): 33540-6
- Yancey P G**., Rodriguez W V, Kilsdonk E PC, Stoudt G W, Johnson W J, Phillips M C and Rothblat G H. (1996) Cellular Cholesterol Efflux Mediated by Cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* 271: 16026-16034
- Young M E**, Karpova T S, Brugger B, Moschenross D M, Wang G K, Schneiter R, Wieland, Cooper J A. (2002) The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Mol Cell Biol* 22:927-34
- Žárský V**, Cvrčková F, Potocký M, and Hála M. (2009) Exocytosis and cell polarity in plants – exocyst and recycling domains. *New Phytologist* 183 (2): 255 - 272

Curriculum vitae

Name: **Reuff**

Vorname: **Muriel**

Geburtsdatum: 5. Mai 1979

Geburtsort: Frankfurt am Main

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Promotionsstudium

Seit 2005

Technische Universität Darmstadt, Promotion in der Arbeitsgruppe „Pflanzliche Zellbiologie“ (PD. Dr. Ulrike Homann) mit dem Thema: „Raumzeitliche Dynamik des pflanzlichen K⁺-Kanals KAT1“

Studium der Biologie

1999 bis 2005

Technische Universität Darmstadt Hauptfächer: Zellbiologie, Mikrobiologie und Genetik.
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe „Molekularbiologie von halophilen Archaea und mikrobielle Biodiversität im Boden“ (Prof. Dr. Felicitas Pfeifer) mit dem Thema: „Untersuchungen zur Binderegion des mcGvpE am *gvpA*-Promotor von *Haloferax mediterranei*“
Abschluss: **Diplom-Biologin**

Schulausbildung

1990 bis 1999

Gymnasium, Musterschule, Frankfurt am Main
Abschluss Abitur

1996 bis 1990

Grundschule Berkersheim, Frankfurt am Main

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Darmstadt, den 29. Juni 2009 _____

Herzlich danken möchte ich...

... **Ulrike Homann** für deine Geduld, Motivation, Hilfe, Diskussion und die tolle Betreuung dieser Arbeit.

... **Gerhard Thiel** für deine hilfreichen Diskussionen im Mitarbeiterseminar und die Übernahme des Koreferats.

... **Melanie Mikosch** für deine gute Freundschaft innerhalb und außerhalb der Uni.

... **Vera Bandmann** für deine vielen guten Anregungen zu dieser Arbeit und deiner fröhlichen und freundschaftlichen Art.

... **Silvia Haase** für deine Hilfe im Labor.

... **Frank Eisenhauer, Julia Theobald, Alice Kress, Susi Beck** und **Maria Wiesmann** für euren Beitrag zu dieser Arbeit.

... der gesamten **Arbeitsgruppe Thiel** dafür, dass ihr für ein super Arbeitsklima und viel Spaß im Labor gesorgt habt.

... meinen Eltern **Bärbel** und **Jörg Reuff** für all eure Unterstützung.

... meinem Freund **Benjamin Ober** für deine Liebe und Geduld.